

1985

**DE ROL VAN MAKROFAGEN
BIJ
PERSISTERENDE ADENOVIRUSINFEKTIES**

F. W. A. HEESSEN

DE ROL VAN MAKROFAGEN BIJ PERSISTERENDE
ADENOVIRUSINFEKTIES

THE ROLE OF MACROPHAGES IN PERSISTENT
ADENOVIRUS INFECTIONS

with a summary in English

**DE ROL VAN MAKROFAGEN
BIJ
PERSISTERENDE ADENOVIRUSINFEKTIES**

PROEFSCHRIFT

Ter verkrijging van de graad van
doctor in de geneeskunde
aan de Katholieke Universiteit te Nijmegen
op gezag van de rector magnificus
Prof. Mr. F. J. F. M. Duynstee
volgens besluit van het college van decanen
in het openbaar te verdedigen op
donderdag 30 oktober 1975, des namiddags te 4 uur

door

Frans Wouter Antoon Heessen

geboren te Uden

Krips Repro Meppel

voor Ria en Inge
aan mijn ouders

Dit onderzoek werd uitgevoerd in het Instituut voor Medische Microbiologie
(Hoofd Prof. Dr. J. van der Veen)

Marij Gielen, Anneke Dekkers, Marie-Louise Geenen en Tineke Heuvelmans
hebben gedurende langere of kortere tijd medewerking verleend aan het
experimentele werk.

De tekeningen zijn vervaardigd door de heer J. G. Wiese

Typewerk en lay-out werden verzorgd door Lody van Velthoven.

INHOUD

LIJST VAN AFKORTINGEN	9
Hoofdstuk 1 INLEIDEND LITERATUUROVERZICHT	11
1 Makrofagen	11
1 1 Inleiding	11
1 2 Functies van makrofagen	12
1 3 Aktivatie van makrofagen	15
1 4 De rol van de makrofaag tijdens virusinfekties	16
2 Muizenadenovirus	19
3 Doel van het onderzoek	20
Hoofdstuk 2 TITRATIEMETHODEN VOOR MUIZENADENOVIRUS	23
1 Inleiding	23
2 Weefselkweken	24
3 Virus	24
4 Onderzoek op kontaminerende virussen	25
5 Zuivering van muizenadenovirus	27
6 Eindpunttitraties in buizen	27
7 Plaquetest op MEF	29
8. Telling van immunofluorescerende cellen	29
8 1 Principe van de methodiek	30
8 2 Invloed van de inkubatietijd	30
8 3 Invloed van de adsorptietijd	31
8 4 Vergelijking van de gevoeligheid van de buizen- titratie en de immunofluorescerende cel-telling	33
8.5 Dosis-werkingsrelatie	33
8 6 Nauwkeurigheid van de immunofluorescerende cel-telling	33
8 7 Invloed van verschillende factoren op de immuno- fluorescerende cel-telling	35
8.8 Telling van immunofluorescerende cellen volgens de methode van Hahon	39
8.9 Vergelijking van de gevoeligheid van de "stationaire" en de volgens Hahon gewijzigde immunofluorescentietitratie	41

9	Diskussie	42
Hoofdstuk 3	VIRUSVERMENIGVULDIGING IN MAKROFAGEN	45
1	Inleiding	45
2	Materiaal en methoden	45
3	Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in normale en ge- stimuleerde makrofagen	47
3 1	Virusvermenigvuldiging in 3 dagen-oude kweken	47
3 2	Invloed van de leeftijd van makrofagenkweken	49
3 3	Invloed van de multipliciteit van infectie	50
3 4	Immunofluorescentie in makrofagen	51
3 5	Warmte-inaktivatie van muizenadenovirus	51
4	Vermenigvuldiging van polyomavirus en MHV-3 in normale en gestimuleerde makrofagen	53
5.	Invloed van andere wijzen van stimulatie en aktivatie op de virusvermenigvuldiging	54
5 1	Akute infectie met adenovirus	54
5 2	Persisterende infecties met adenovirus	55
5.3.	Toediening van Toxoplasma, BCG, endotoxine en kalfsserum	57
6	In vivo-proeven met thioglycollaat	63
7.	Diskussie	64
Hoofdstuk 4	METING VAN DE STIMULATIE EN AKTIVATIE VAN MAKROFAGEN	69
1	Inleiding	69
1 1	Fagocytose en afbraak	69
1 2	DNA-synthese	71
2	Materiaal en methoden	72
3	Fagocytose en inaktivatie van T7 bakteriofagen door thioglycollaat- makrofagen	73
4	DNA-synthese door thioglycollaatmakrofagen	75
5	Diskussie	78
SAMENVATTING		81
SUMMARY		85
LITERATUUR		89
CURRICULUM VITAE		100

LIJST VAN AFKORTINGEN

ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Mycobacterium bovis, stam Bacille Calmette-Guérin
CBR	Komplementbindingsreactie
CPE	Cytopathologisch effect
cpm	Counts per minute
Dimethyl POPOP	1,4-bis-[2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)] - benzeen
FITC	Fluoresceïne-isothiocyanaat
LD ₅₀	50% letale dosis
MEF	Muizenembryo-fibroblasten
MEM	Minimum essential medium
MHV	Muizenhepatitisvirus
MVM	Minute virus of mice
PBS	Phosphate buffered saline
PFU	Plaque forming unit
PPO	2,5-diphenyloxazol
RES	Retikulo-endotheliaal systeem
rpm	Revolutions per minute
SMK	Suckling mouse kidney
T-cel	Thymus-afhankelijke lymfocyt
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose
U	Unit

INLEIDEND LITERATUUROVERZICHT

1 MAKROFAGEN

1.1 Inleiding

Reeds aan het begin van deze eeuw werd het belang aangetoond van fagocyterende cellen bij het verweer tegen bacteriële infecties. De Russische zooloog Metchnikoff beschreef een groep cellen die aanwezig zijn bij alle metazoa en die grotendeels verantwoordelijk zijn voor de afweer van het organisme tegen aanvallen van buiten af (Metchnikoff, 1901). Weliswaar waren er al eerder fagocyterende cellen beschreven, maar Metchnikoff toonde voor het eerst de biologische betekenis hiervan aan. In proeven over de opname van kleurstofpartikels, erythrocyten en bacteriën door fagocyterende cellen bij een groot aantal diersoorten, van sponsen en zeesterren tot en met de zoogdieren, werd door hem de funktionele identiteit van deze cellen aangetoond. Hij noemde ze makrofagen om ze te onderscheiden van de kleinere cirkulerende leukocyten of mikrofagen, die nu polymorfonukleaire leukocyten worden genoemd. In verschillende recente overzichtsartikelen wordt uitvoerig de ontwikkeling van de kennis op dit terrein beschreven (Pearsall and Weiser, 1970, Vernon-Roberts, 1972, Carr, 1973).

Aschoff voerde de term retikulo-endotheliaal systeem in om daarmee alle cellen aan te geven die de capaciteit bezitten om vitale kleurstoffen op te nemen. Men nam aan dat deze cellen deelnamen aan de vorming van het "retikulum" van de lymfeklieren en de milt (het buiten de sinussen gelegen vast merg) en dat ze het endotheel vormden van de bloed- en lymfesinussen. Door Aschoff werden de vitale kleurstof opnemende cellen ingedeeld in zes groepen met toenemende capaciteit (Aschoff, 1924).

Tot voor kort werden de mononukleaire fagocyten, waarmee bedoeld worden de makrofagen in de weefsels, de monocyten in het perifere bloed en hun voorlopers in het beenmerg (promonocyten en monoblasten), inderdaad beschouwd als een onderdeel van het retikulo-endotheliale systeem. In 1970

werd echter door Langevoort en anderen gesteld dat er geen R.E.S. bestaat. Volgens de criteria van Aschoff zelf bestaat een systeem uit cellen met dezelfde oorsprong, morfologie en functie. Het R.E.S. van Aschoff bevatte echter behalve de mononukleaire fagocyten die afstammen van de haemopoietische stamcellen, ook cellen van andere oorsprong, namelijk retikulumcellen, dendrietcellen, fibroblasten en endotheelcellen die van het mesenchym afkomstig zijn. Ook de morfologie van deze cellen is verschillend, alsmede hun functie (van Furth, 1974). Daarom werd voorgesteld voortaan de benaming mononukleaire fagocyten systeem te gebruiken. Tabel 1 geeft de indeling van het mononukleaire fagocyten systeem, ontleend aan van Furth (1974). De mononukleaire fagocyten komen dus voort uit de haemopoietische stamcellen en ontwikkelen zich nog in het beenmerg tot snel delende promonocyten en daarna tot cirkulerende bloedmonocyten.

Nog steeds verschijnen er mededelingen over de mogelijkheid dat sommige makrofagen ontstaan uit voorlopers met de morfologie van lymfocyten. Als dit al ooit gebeurt onder normale fysiologische omstandigheden, dan nog blijft het een minimale bijdrage aan de vorming van de totale voorraad makrofagen in het lichaam (Vernon-Roberts, 1969, Pearsall en Weiser, 1970). Of rijpe makrofagen nog wel tot deling in staat zijn, is ook nog steeds een twistpunt (Nelson, 1969, van Furth et al, 1973).

De meest opvallende eigenschap van makrofagen is dat ze tot sterke fagocytose in staat zijn. Hiervoor bezitten ze een zeer actieve celmembraan, die met behulp van fasekontrastmikroskopie aan levende cellen te zien is als bewegend hyaloplasma of "ruffles" en op elektronenmikroskopische opnamen als filopodia. Verder zijn ze beweeglijk, maar niet zo snel als polymorfonukleaire leukocyten. Een kenmerkende eigenschap is ook het hoge gehalte aan lysosomen. Deze zijn zeker van belang bij de afbraak van opgenomen materiaal, maar vormen geen voldoende verklaring voor de waargenomen snelle intracellulaire afbraak van mikro-organismen (Nelson, 1972). Daarom neemt men aan dat er zich meerdere mikrobicide stoffen in de cellen bevinden bijvoorbeeld waterstofperoxide (Stossel, 1974 b) en superoxide (Karnovsky, 1974, Drath and Karnovsky, 1975).

1.2 Functies van de makrofagen

Makrofagen nemen op een groot aantal manieren deel aan de verdediging van het organisme. Ze verwijderen celresten gedurende involutie en herstel

Tabel 1

Indeling van het mononukleaire fagocyten systeem
(ontleend aan van Furth, 1974)

Cellen	Lokalisatie
Stamcel	Beenmerg
Monoblasten	Beenmerg
Promonocyten	Beenmerg
Monocyten	Beenmerg + perifere bloed
Makrofagen	Weefsels bindweefsel (histiocyten) lever (Kupffer cellen) long (alveolaire makrofagen) lymfeklieren (vrije en gefixeerde makrofagen) beenmerg (makrofagen) sereuse holtes (pleurale en peritoneale makrofagen) botweefsel (osteoklasten) zenuwweefsel (mikroglia cellen)

van weefsels en vernietigen mikro-organismen door fagocytose. Ze doen dit vaak als deel van een georganiseerd extravasculair aggregaat van ontstekingscellen of granuloom. Verder kunnen makrofagen antigenen opnemen en verwerken. Bovendien zijn ze in staat om cellen die afwijken in antigene eigenschappen, bijvoorbeeld tumorcellen, te doden. Er zijn verschillende stoffen die vooral door makrofagen worden gevormd en uitgescheiden, bijvoorbeeld lysozym, interferon en pyrogeen. Voor recente overzichten van literatuur over de fagocytose verwijzen wij naar Carr (1973) en Stossel (1974 a, b, c).

Over de opname van antigenen door makrofagen en de verwerking tot immunologisch actieve produkten zijn veel gegevens voorhanden (zie over-

zichtsartikel van Nelson, 1969) Niet alle immunologische reacties zijn echter van de aanwezigheid van makrofagen afhankelijk Lymfocyten kunnen namelijk met sommige antigenen direct reageren zonder tussenkomst van makrofagen (Mandel et al, 1969) Na de opname van antigeen door de makrofaag wordt het gedeeltelijk afgebroken Een ander deel blijft echter lange tijd achter in de cel in een bijzonder sterk immunogene vorm (Unanue et al, 1969) In het geval dat antigenen door makrofagen worden opgenomen en hierna door lymfocyten antistoffen tegen de antigenen worden gevormd, moet er wel een of andere interactie tussen beide celtypen hebben plaatsgevonden De interactie zou zowel via oplosbare factoren als door direct contact kunnen plaats vinden In vitro zijn er wel associaties van lymfocyten en makrofagen waargenomen (Berman, 1966, Smith en Goldman, 1970) Men zag lymfocyten rond makrofagen bewegen en er cytoplasmatische uitsteeksels in duwen Dit kan men uitstekend waarnemen met behulp van "time lapse" fotografie van levende cellen onder fasecontrast Over de biochemische interacties tussen lymfocyt en makrofaag bij de synthese van antistoffen is veel minder bekend Men heeft aanvankelijk wel gemeend dat het mogelijk was om uit makrofagen die in kontakt waren gebracht met antigeen, RNA te isoleren dat lymfocyten in vitro zou kunnen aanzetten tot de vorming van specifieke antistoffen (Fishman, 1961, Bishop et al, 1967) Latere onderzoeken maakten aanmerkelijk dat het hierbij om een laboratoriumartefakt gaat Waarschijnlijk is het zo dat de enige functie van de makrofagen hierbij is, het antigeen in gekoncentreerde vorm aan de lymfocyten aan te bieden (Bona et al, 1973)

Over de rol van de makrofaag bij de ontwikkeling en expressie van de cellulaire immuniteit verschenen overzichten van onder anderen Mackaness (1970 a), Nelson (1972) en Vernon-Roberts (1972) Vooral de experimentele infectie met *Listeria monocytogenes* bij de muis bleek een uitstekend model te zijn dat veel kennis op dit terrein heeft opgeleverd (Mackaness, 1970 a, b) Na een subletale dosis van deze bacteriën werden de muizen resistent tegen veel grotere doses, zelfs tegen een dosis van 100 LD₅₀ Peritoneale makrofagen van de resistente muizen bleken in vitro ook resistent te zijn tegen infectie met *Listeria*. De resistentie nam na verloop van tijd weer af. Deze cellulaire immuniteit werd niet ontwikkeld na immunisatie van muizen met gedode bacteriecellen, evenmin na passieve immunisatie met serum dat antistoffen tegen *Listeria* bevatte Het meest opvallend bij de verkregen cellulaire weerstand is dat de expressie ervan specifiek is De muizen bleken namelijk ook resistent te zijn tegen infectie met totaal niet verwante

mikro-organismen, zoals *Brucella abortus* en BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) Ook muizen die primair met deze organismen of met *Salmonella typhimurium* of *Toxoplasma gondii* waren geïnfecteerd, en muizen die "graft versus host" reacties vertoonden, bleken in alle gevallen makrofagen te bezitten met een verhoogde aspecifieke mikrobicide capaciteit. Deze makrofagen worden meestal "geactiveerde" makrofagen genoemd.

1.3 Aktivatie van makrofagen

Geactiveerde makrofagen hebben een verhoogde capaciteit om intracellulair groeiende mikro-organismen te doden. Daarnaast zijn er nog een aantal andere eigenschappen, waarin ze verschillen van normale makrofagen: ze hechten sneller aan glas en plastic oppervlakken en spreiden zich snel uit. Ze zien er groter uit dan normaal en men ziet met een fasekontrastmikroskoop meer mitochondria en granules, die waarschijnlijk grotendeels lysosomen zijn. Deze eigenschappen heeft men waargenomen bij cellen van muizen die met BCG en *Listeria* waren geïnfecteerd. De snelheid waarmee deze makrofagen inerte partikels, zoals polystyreen bolletjes, opnemen is vergroot, en ook het totale aantal partikels dat ze kunnen opnemen (Nelson, 1972).

Elektronenmikroskopisch ziet men in geactiveerde makrofagen een uitgebreider Golgi apparaat, meer lysosomen, een gehydrateerd cytoplasma en een groter aantal vrije ribosomen.

De geactiveerde makrofagen zijn niet alleen beter in staat om bacteriën op te nemen en te doden, ook schimmels (Gentry en Remington, 1971) en intracellulair levende protozoa zoals *Leishmania enriettii* (Mauel, 1974) worden door deze cellen efficiënter bestreden. Ook zijn geactiveerde makrofagen beter in staat om tumorcellen te doden (Holtermann et al, 1973, Hibbs et al, 1972, Yang en Nowotny, 1974, Krahenbuhl en Remington, 1974). Hoe de aktivatie van de makrofagen tot stand komt, is minder goed bekend. Er zijn aanwijzingen dat de invloed van een stimulus op T-lymfocyten nodig is (Nathan et al, 1973, Petit en Unanue, 1974). Er is dan een specifiek en een aspecifiek deel van de reactie. De stimulatie van de T-cellen is specifiek. Bij herhaalde aanbieding van de stimulus reageren ze ook sneller en heviger. De reactie van de makrofagen is aspecifiek: ze reageren niet alleen heviger op het antigeen of het organisme dat de aktivatie veroorzaakte, maar ook tegen volstrekt niet verwante organismen.

Men kan aktivatie van makrofagen ook in vitro opwekken. Dit kan specifiek, door toevoegen van endotoxinen of andere bacteriele producten in het kweekmedium. Deze stoffen werken dan rechtstreeks op de makrofagen. Specifieke aktivatie van makrofagen verkrijgt men door de cellen te inkuberen met T-lymfocyten en een antigeen waarvoor de lymfocyten gesensibiliseerd zijn, of door de supernatant van een kweek van gesensibiliseerde T-cellen met antigeen aan makrofagen toe te voegen (Sheagren en Hahn, 1974). Er zijn aanwijzingen dat de T-cellen hun invloed op de makrofagen uitoefenen via lymfokinen. De faktor die voor dit effect verantwoordelijk is, is waarschijnlijk identiek aan MIF ("migration inhibition factor") (Nathan et al, 1973).

1.4 De rol van de makrofaag tijdens virusinfekties

Dat de makrofagen een rol spelen bij de pathogenese en de afweer bij virusinfekties is pas relatief laat bekend geworden. In het overzicht van Mims (1964) wordt de vroegste kennis op dit terrein samengevat. Fenner (1948) stelde reeds dat bij muizen met ectromelia (muizepokken) infectie het virus uit de bloedstroom wordt opgenomen door makrofagen in de lever en milt en dat deze organen daardoor worden geïnfecteerd. Florman en Enders (1942) wezen erop, dat monocyten gemakkelijk vacciniavirus door het lichaam kunnen transporteren, omdat ze door dit virus kunnen worden geïnfecteerd en zich vrij door de weefsels kunnen bewegen. Nadien is het mede door toepassing van de immunofluorescentietechniek mogelijk geworden om een nauwkeurig beeld te krijgen van de pathogenese van virusinfekties, omdat men kon zien welke cellen er waren geïnfecteerd. Fraaie resultaten werden verkregen met pokvirussen omdat deze met immunofluorescentie gemakkelijk waarneembaar waren (Mims, 1964).

Omdat de makrofagen overal verspreid in het lichaam voorkomen en de belangrijkste lichaamsvloeistoffen en weefselholtes bewaken, komen ze al kort na het begin van de infectie met het virus in contact. Zo kunnen virussen die in het bloed terechtkomen, vanaf de primaire plaats van vermenigvuldiging of door injectie in de bloedstroom, opgenomen worden door de Kuppfercellen of andere makrofagen die de wand van de bloedsinussen bedekken. Meestal kunnen de virussen zich niet of nauwelijks in makrofagen vermenigvuldigen en worden ze in deze cellen afgebroken. Soms slagen ze er echter in om zich te verspreiden naar andere cellen die erg gevoelig zijn, zoals de leverparenchymcellen. Is de makrofagenbarrière eenmaal gepasseerd, dan

vindt er een uitgebreide virusvermenigvuldiging in de parenchymcellen plaats. Dit kan men experimenteel bereiken door het virus in de galgang te spuiten. Het leverparenchym wordt dan direkt geïnfecteerd. Men kan de makrofagen ook uitschakelen door proefdieren in te spuiten met silicaatpartikels of met anti-makrofagen-serum (Zisman et al, 1970). De weerstand van jonge volwassen muizen, die resistent waren voor herpes simplex virus, werd hierdoor verbroken. De behandelde dieren stierven aan de infectie, waarbij hoge titers van het virus in de lever gevonden werden. Dit ging gepaard met ernstige levernekrose. Makrofagen vormen ook een barrière voor de hersenen, die voor vele virussen gevoelig zijn. Passeert men deze barrière door virus via een intracerebrale injectie rechtstreeks met de hersenen in contact te brengen, dan veroorzaakt dit vaak een letale infectie, ook bij volwassen dieren, terwijl andere wijzen van toediening van virus geen effect hebben. Hiervan wordt gebruik gemaakt bij de isolatie van menselijke pathogene virussen via muizen.

Als de makrofagen een belangrijke barrière vormen voor de verspreiding van virusinfecties, dan is het te verwachten dat er verband bestaat tussen het vermogen van een virus om zich in makrofagen te vermenigvuldigen en de virulentie in het volwassen dier. In een aantal gevallen is inderdaad een dergelijk verband aangetoond. Het bekendste voorbeeld is wel dat van de gevoeligheid van muizen voor muizenhepatitisvirus (Bang en Warwick, 1960). Het gaat om de door Nelson geïsoleerde stam van muizenhepatitisvirus MHV-PRI (Princeton Rockefeller Institute) en om twee muizenstammen, de PRI stam die normaal werd gekweekt, en de C3H/He, een inteeltstam. MHV-PRI veroorzaakte een dodelijke infectie bij PRI muizen en vermeerderde zich in vitro met een cytopathologisch effect in de makrofagen van deze muizenstam. C3H muizen bleken daarentegen ongevoelig te zijn voor dit virus en het virus vermeerderde zich ook niet in hun makrofagen. Alleen de makrofagen van de PRI muizen waren in vitro gevoelig voor het virus, fibroblastenkweken van dezelfde muizen werden niet aangetast. Interessant is overigens dat de gevoeligheid van de PRI en C3H muizen voor enkele arbo-B virussen, zoals West Nile virus en gele koorts-virus, stam 17D, juist omgekeerd is. C3H muizen zijn gevoelig en PRI muizen zijn ongevoelig en dit korrespondeert weer met de virusvermenigvuldiging in de makrofagen (Goodman en Koprowski, 1962). De gevoeligheid van muizen voor respectievelijk arbovirus en MHV-PRI zijn erfelijke eigenschappen die geheel onafhankelijk van elkaar overerven.

Behalve de genetisch bepaalde gevoeligheid en resistentie van bepaalde muizestammen speelt ook de leeftijd een rol bij de resistentie tegen sommige virussen. De invloed van de leeftijd berust vermoedelijk op de omstandigheid dat makrofagen van volwassen muizen beter in staat zijn om de vermenigvuldiging en verspreiding van virus te beperken dan makrofagen van jonge dieren. De betekenis van makrofagen voor de aan de leeftijd gebonden resistentie is onder andere aangetoond bij experimentele infecties met herpes simplex virus (Johnson, 1964, Hirsch et al, 1970), met MHV (Gallily et al, 1964, Le Prevost et al, 1975) en Cocksackie virus (Rager-Zisman en Allison, 1973). Men kan jonge dieren gedeeltelijk beschermen tegen een letale dosis virus, door ze in te spuiten met peritoneale cellen van volwassen muizen (Hirsch et al, 1970, Rager-Zisman en Allison, 1973).

Er zijn dus een aantal virus-gastheer relaties bekend waarbij de gevoeligheid van de gastheer parallel loopt met de gevoeligheid van de makrofagen *in vitro*. Dit is echter niet altijd het geval. Een voorbeeld hiervan is beschreven door Eustatia et al (1972). Het bleek dat de muizenhepatitis-virusstam MHV-s infectieus is voor zeer jonge muizen, echter niet voor volwassen muizen. Toch groeit dit virus goed in makrofagen van volwassen muizen.

Het is van belang te bedenken dat bij de meeste onderzoeken naar de gevoeligheid van proefdieren voor infecties gebruik gemaakt wordt van een letale dosis virus of bacteriën. Dit is een grof criterium. Om geringe veranderingen in de gevoeligheid -die waarschijnlijk beter overeenkomen met de natuurlijke omstandigheden- op te sporen zou men andere indicatoren moeten gebruiken, bijv. de uitgebreidheid van lesies in aangetaste organen, de virustiters in organen, de duur van virusproductie of het wel- of niet-aanslaan van een infectie.

Voor een meer uitgebreide bespreking van de makrofaag-virus interactie verwijzen wij naar de overzichten van Silverstein (1970) en Allison (1970, 1974).

De virulentie van een virus voor proefdieren wordt onder andere bepaald door het vermogen van het virus zich in makrofagen te vermenigvuldigen. Het is echter duidelijk dat de rol van de makrofagen slechts één uit een heel arsenaal van verdedigingsmechanismen tegen virusinfecties is. Ook andere processen zijn van betekenis zoals de vorming van specifieke antistoffen, de ontwikkeling van cellulaire immuniteit, de vorming van interferon en het optreden van koorts. Al deze reacties vormen samen de verdediging tegen de

infektie Het belang van de makrofaag is echter heel duidelijk

2 MUIZENADENOVIRUS

Muizenadenovirus werd voor het eerst in de Verenigde Staten geïsoleerd door Hartley en Rowe (1960) Het virus werd ontdekt tijdens pogingen om een muizenleukemievirus in vitro te kweken Het adenovirus veroorzaakte cytopathologische veranderingen in kweken van muizenembryo-fibroblasten. De geïsoleerde virusstam werd met FL aangeduid Een groot deel van de muizen die in het laboratorium van de onderzoekers in voorraad was, bleek met adenovirus geïnfecteerd te zijn, bij 45% van de oudere dieren werden namelijk complementbindende antistoffen tegen adenovirus gevonden Enige jaren later werd in Japan een muizenadenovirus geïsoleerd (Hashimoto et al, 1966). Het virus werd aangetroffen in de faeces van gezonde muizen. De stam werd met K87 aangeduid Dit virus veroorzaakte cytopathologische veranderingen in kweken van muizenmercellen In 1969 werd door Duitse onderzoekers (Missal et al, 1969) adenovirus gekweekt uit faeces, darmweefsel en longen van laboratoriummuizen De isolatie vond plaats in primaire kweken van niercellen van de muis

Van de drie beschreven virusstammen vertoont de FL stam de grootste virulentie Dit virus veroorzaakte dodelijke infecties bij zeer jonge muizen. Voor volwassen muizen is het niet pathogeen. De beide overige stammen, K87 en de stam van Missal, waren apathogeen. Op geen enkele wijze kon worden aangetoond dat ze ziekte konden veroorzaken (Sugiyama et al, 1967, Missal, 1969) Het is opvallend dat de K87 stam en de stam van Missal in faeces werden aangetroffen, terwijl de FL stam niet uit de faeces geïsoleerd kon worden, ook niet in de akute fase van de infectie (van der Veen en Mes, 1973), maar wel uit de urine De FL stam is waarschijnlijk ook de enige die een persisterende infectie veroorzaakt

Heck et al (1972) en van der Veen en Mes (1973) beschreven uitvoerig de pathogenese van experimentele infecties met de FL stam bij jonge muizen. Het virus veroorzaakt eerst een gegeneraliseerde infectie, zowel na intra-peritoneale als na intranasale inoculatie Uit een hele reeks organen kan men het adenovirus isoleren De muizen overleven de infectie echter en het virus blijft alleen aantoonbaar in de urine. Zelfs twee jaar na de infectie kan het nog uit de urine geïsoleerd worden. Het is dus een typisch voorbeeld van een persisterend virus.

Ook andere adenovirussen veroorzaken persisterende infecties. Uit adenoiden en tonsillen van overigens gezonde kinderen kan men vaak de humane typen 1, 2, 5 en 6 isoleren (van der Veen en Lambriex, 1973). Men mag aanrekenen dat de aanwezigheid van adenovirus in dit weefsel in de regel wijst op het bestaan van een persisterende infectie. Adenovirus is bij de mens ook in de urine aangetroffen. Het is echter niet bekend of dit het gevolg is van een persisterende infectie (Gutekunst en Heggie, 1961, Numazaki et al, 1968). Verder blijkt ook hondenadenovirus dat hepatitis contagiosa canis veroorzaakt, een persisterende infectie te kunnen veroorzaken. Het virus kan gedurende vele maanden in de urine worden uitgescheiden (Rowe en Hartley, 1962).

Bij konijnen die met menselijk adenovirus type 2 of 5 zijn geïnfecteerd, kan men gedurende lange tijd zeer hoge antistoftiters in het bloed vinden (Reddick en Lefkowitz, 1969, van Nieuwstadt, 1972). Zowel deze bevinding als de waarneming van Pereira en Kelly (1957) dat adenovirus type 5 nog 2 maanden na infectie van konijnen uit kweken van miltcellen kan worden geïsoleerd, wijzen op een persisterende infectie. Allison (1970) onderzocht welk celtype hiervoor verantwoordelijk was. Hij legde kweken aan van lymfocyten en makrofagen van een konijn dat 6 maanden tevoren met adenovirus type 5 was geïnfecteerd. Alleen kweken van makrofagen van de milt, peritoneale holte en lymfeklieren leverden virus op. Werden deze kweken tegelijk ingezet, dan werden die van de milt het eerst positief. In de milt was dus vermoedelijk de hoogste virusconcentratie aanwezig. Soortgelijke experimenten werden door Faucon et al (1974) bij caviae verricht, waarbij adenovirus ook weer in makrofagen werd aangetroffen. Ook van hondenadenovirus is het bekend dat het zich in makrofagen kan vermenigvuldigen (Coffin et al, 1953, Gocke et al, 1967).

Op grond van deze bevindingen, samen met de meer algemene gegevens over makrofaag-virus interactie (zie 1.4), lijkt het zeer waarschijnlijk dat makrofagen een belangrijke rol spelen bij de pathogenese van adenovirus-infectie en bij de persistentie van adenovirussen.

3. DOEL VAN HET ONDERZOEK

Het doel van ons onderzoek was het inzicht in de betekenis van de makrofaag voor de pathogenese van virusinfecties, met name persisterende infecties, te verdiepen. Wij maakten hierbij gebruik van een model systeem bij

proefdieren, namelijk muizenadenovirus (de FL stam) en zijn natuurlijke gastheer.

Het onderzoek was in de eerste plaats gericht op de vraag of makrofagen gevoelig zijn voor adenovirus of -eventueel- onder bepaalde omstandigheden gevoelig worden. Wij hebben daarom proeven verricht om na te gaan of het virus kan overleven of zich misschien zelfs kan vermenigvuldigen in makrofagen (hoofdstuk 3). Voor deze proeven was een nauwkeurige en gevoelige titratiemethode vereist en was het nodig te beschikken over een gezuiverde virusstam die vrij was van kontaminerende virussen (hoofdstuk 2). Omdat uit onze studie bleek dat adenovirus zich kon vermenigvuldigen in -op bepaalde wijze- gestimuleerde makrofagen, hebben wij tenslotte een onderzoek verricht naar eigenschappen van gestimuleerde makrofagen die hiervoor verantwoordelijk zouden kunnen zijn (hoofdstuk 4).

TITRATIEMETHODEN VOOR MUIZENADENOVIRUS

1 INLEIDING

Voor onderzoek naar de vermenigvuldiging van virus is een nauwkeurige en gevoelige titratiemethode vereist. Volgens Hartley en Rowe (1960) is de MAP ('mouse antibody production') test de gevoeligste methode om muizenadenovirus aan te tonen. De methode is volgens hen gevoeliger dan isolatieproeven in MEF-(muizenembryo-fibroblasten)kweken. Verder vindt men in de literatuur wel vage aanduidingen, maar geen nauwkeurige beschrijving van een plaque test op MEF-kweken (Crawford 1966, Blairlock et al, 1968). Eustatia (1971) gebruikt voor de titratie van muizenadenovirus buizen met L929-cellen en leest de titratie na 14 dagen af op grond van het CPL. Van der Veen en Mes (1973) gebruiken ook L929-cellen, maar lezen de titratie pas na 50 dagen af na 5 passages, ieder van 10 dagen. Wouts en van Nieuwstadt (niet gepubliceerd onderzoek) hebben een infectiviteitstest ontwikkeld met behulp van de immunofluorescentiereactie in L929- en SMK ('suckling mouse kidney')-cellen.

Het leek ons van belang eerst verschillende titratiemethoden te ontwikkelen en met elkaar te vergelijken om vervolgens hieruit een keuze voor ons onderzoek te maken. Wij hebben de volgende methodieken onderzocht:

1e Eindpunttitratie op L929-cellen

2e Plaque test op MEF

3e Immunofluorescentie test op L929-cellen

Voor ons onderzoek was verder een mededeling van Crawford (1966) van belang waarin er op werd gewezen dat een door hem gebruikte muizenadenovirusstam zowel met polyomavirus als met MVM ('minute virus of mice') was besmet. Crawford had de virusstam ontvangen van dr. W. P. Rowe (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Ook onze stam was van Rowe afkomstig. We moesten dus aannemen dat ook onze stam verontreinigd was met andere virussen. Wij hebben daarom eerst het virus gezuiverd door het

virus drie maal in hoge verdunningen op L929-cellen te passeren volgens de "terminal dilution" methode van Burnet (1955)

2 WEEFSELKWEKEN

Voor het opkweken van voorraden van muizenadenovirus werden L929-cellen gebruikt (Sanford et al, 1948). De cellen werden gekweekt in flessen in Eagle's basaal medium met Hanks' oplossing. Aan het medium werd 10% geïnactiveerd kalfsserum (inactivatie 30 min bij 56°C) en 50 U penicilline en 50 µgr kanamycine per ml toegevoegd. De cellen werden 2 maal per week omgezet met een oplossing van 0,25% trypsine in met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (Dulbecco's PBS). Het aantal flessen werd bij iedere omzetting verdubbeld.

Muizenembryo-fibroblasten (MEF) werden verkregen door het trypsineren van bijna voldragen embryo's van Swiss muizen met een oplossing van 0,5% trypsine in PBS. De cellen werden overgebracht in flessen. Nadat de flessen volgegroeid waren, werden de cellen losgemaakt met trypsine en in schaaltes verder gekweekt en beënt met virus. Er werden dus steeds sekundaire kweken gebruikt. Het kweekmedium voor MEF bestond uit Hanks' oplossing met 0,5% lactalbuminehydrolysaat (LAH) en 10% geïnactiveerd kalfsserum. Penicilline en streptomycine werden in een concentratie van respectievelijk 100 U en 100 µgr per ml toegevoegd.

Muizeniercellen (SMK) werden verkregen door het trypsineren van nieren van jonge Swiss muizen met een leeftijd van 14 dagen. De behandeling van de cellen was verder gelijk aan die van MEF. Ook van SMK-cellen werden voor de experimenten steeds sekundaire kweken gebruikt.

3. VIRUS

De FL stam van muizenadenovirus (Hartley en Rowe, 1960) werd in 1967 ontvangen van dr. W. P. Rowe (Bethesda, USA). Het virus werd in ons laboratorium drie maal gepasseerd in SMK-cellen en twee maal in L929-cellen. Ons uitgangsmateriaal had dus reeds twee passages in L929-cellen doorgeemaakt.

Polyomavirus, stam LID-1 (Rowe et al, 1959), werd in 1969 ontvangen van de ATCC (American Type Culture Collection). Het werd gekweekt in SMK-cellen. De muizen werden 1-2 dagen na de geboorte met het virus geïn-

fekteerd. Veertien dagen later werden dan niercelkweken van deze muizen gemaakt. Titraties van polyomavirus werden steeds uitgevoerd in buizen met sekundaire SMK-kweken. De buizen werden 2 maal per week verversd en na 21 dagen voor het laatst afgelezen.

"Minute virus of mice" (MVM) stam CR, werd in 1971 ontvangen van dr. J. C. Parker (Bethesda, USA). Het virus werd gekweekt in primaire en sekundaire kulturen van rattenembryo-fibroblasten. De cellen werden op dezelfde wijze behandeld als MEF. Ze werden steeds 24-48 uur na het aanleggen van de kweek met virus beënt. Titraties van MVM vonden ook plaats in buizen met rattenembryo-fibroblasten. De buizen werden na 5 dagen afgelezen.

4 ONDERZOEK OP KONTAMINERENDE VIRUSSEN

Omdat wij moesten aannemen dat de door ons ontvangen muizenadenovirusstam verontreinigd was met polyomavirus en MVM, hebben wij eerst nagegaan of er inderdaad in de virussuspensie andere virussen aantoonbaar waren. Twee eenvoudige methoden hebben we hiervoor toegepast, namelijk de hemagglutinatie- en immunofluorescentiereactie.

Hemagglutinatie Polyomavirus en MVM zijn beide hemagglutinerende virussen. De virussen kunnen op hun hemagglutinatie-gedrag worden onderscheiden. Alleen MVM agglutineert cavia-erythrocyten bij 37°C en bij een pH van 8.5. Alleen polyomavirus agglutineert schapenerythrocyten bij kamertemperatuur en bij een pH van 7.2. Beide virussen agglutineren cavia-erythrocyten bij kamertemperatuur en bij een pH van 7.2.

Met enkele monsters muizenadenovirus zijn hemagglutinatiereacties uitgevoerd. Ter controle zijn eveneens reacties verricht met suspensies van MVM en polyomavirus. De uitkomsten zijn weergegeven in tabel 2. Het blijkt dat in de suspensies van muizenadenovirus geen hemagglutinerende activiteit aantoonbaar is. De uitkomsten van de hemagglutinatiereacties met MVM en polyomavirus zijn overeenkomstig de verwachting wel positief.

Immunofluorescentiereactie Met behulp van de indirecte immunofluorescentiereactie kunnen virusantigenen in geïnfecteerde cellen worden aangetoond. Aan geïnfecteerde celkulturen wordt eerst virusspecifiek antiserum toegevoegd. Daarna kunnen met een antiserum, dat gericht is tegen de globulines van het virusspecifieke antiserum en dat gekonjugeerd is met fluoresceïne-isothiocyanaat, eventueel aan virus gebonden antistoffen worden aangetoond, met behulp van een fluorescentiemikroskoop.

We hebben deze methodiek eerst getest in schaaltes met SMK-cellen,

Tabel 2 Hemagglutinatiereakties met MVM, polyomavirus en muizenadenovirus

Virus	Hemagglutinatietiter ²⁾ met erythrocyten van	
	Cavia	Schaap
MVM	1 1024	< 1 2
Polyomavirus	1 64	1 128
Muizenadenovirus ¹⁾	< 1 2	< 1 2

- 1) Proeven met twee virusstammen die respectievelijk in SMK- en L929-cellen waren gekweekt
- 2) Bepaling bij kamertemperatuur en bij pH 7,2

waarvan sommige geïnfecteerd waren met MVM en andere met polyomavirus. Na 48 en 72 uur werden een aantal schaaltes gefixeerd met methanol. Vervolgens werd verdund antiserum (Microbiological Associates) tegen MVM en polyomavirus toegevoegd. De antisera waren bereid in muizen. Na wassen werd anti-muis-konjugaat (Nordic) toegevoegd. Hierna werden de schaaltes onder de fluorescentiemikroskoop bekeken. In beide soorten kweken, respectievelijk met MVM en polyomavirus geïnfecteerd, werd een groot aantal fluorescerende celkernen waargenomen.

Nadat op deze wijze was aangetoond dat infecties met MVM en polyomavirus door middel van de immunofluorescentiereactie kunnen worden aangetoond, hebben we deze techniek toegepast voor kweken die met muizenadenovirus waren geïnfecteerd. Een aantal schaaltes werden beënt met muizenadenovirus in hoge concentratie. Na 48 en 72 uur werden weer antisera tegen MVM en polyomavirus en vervolgens anti-muis-konjugaat toegevoegd op de wijze die hierboven is beschreven. Er werden in de met muizenadenovirus geïnfecteerde kulturen geen fluorescerende cellen waargenomen.

Met geen van beide methodieken kon dus polyomavirus of MVM in de suspensie van muizenadenovirus worden aangetoond. Dit wijst er op dat de concentratie van de kontaminerende virussen laag was. Het is derhalve mogelijk om met behulp van de terminale verdunningsmethode het virus te zuiveren. Voorwaarde daarvoor is namelijk dat van het te zuiveren virus een grotere concentratie aanwezig is dan van de contaminanten.

5 ZUIVERING VAN MUIZENADENOVIRUS

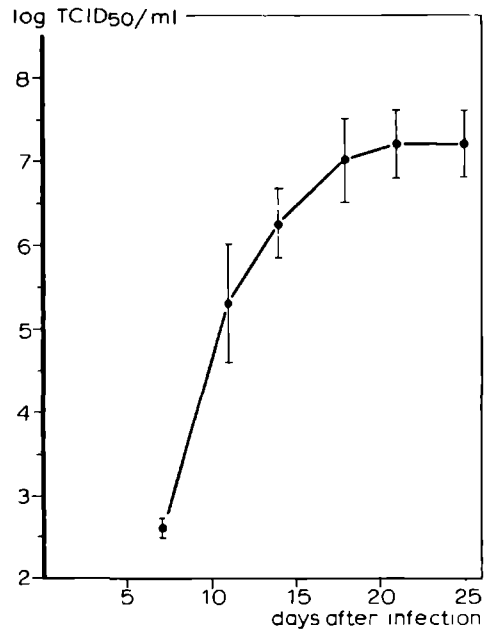
Om het muizenadenovirus te zuiveren werden 10-voudige verdunningsreeksen van het virus gemaakt. Het virus was reeds 2 maal in L929-cellen gepasseerd. Iedere verdunning werd in 4 buizen geënt. Het medium was gelijk aan het groeimedum voor L929-cellen. De serumconcentratie werd echter tot 3% gereduceerd en kanamycine werd vervangen door een gelijke hoeveelheid streptomycine. Het onderhoudsmedium werd 2 maal per week verversd en na 20 dagen werden de cellen bekeken. Daarna werden de kweken geoogst met de hoogste virusverdunning die nog een cytopathologisch effect toonden. De kweken werden 3 maal bevroren en ontdooid en na centrifugeren gedurende 20 min. bij 2000 rpm werd de supernatant weer in verschillende verdunningen doorgekweekt. Dezelfde handeling werd toegepast met kweken met de eerste hierop volgende virusverdunning die dus geen cytopathologisch effect toonden. Na deze passages werd dezelfde procedure gevolgd. In totaal werd zo 3 maal een "terminal dilution" uitgevoerd. Hierbij werd steeds gewerkt met de hoogste virusverdunning die bij doorkweken in de volgende passage nog virus opleverde. Daarna werd de virusstam nog 2 maal gepasseerd voor het opkweken van een gebruiksvoorraad. Zeer waarschijnlijk zijn door deze wijze van uitverdunnen de beide kontaminanten, die in een lagere concentratie aanwezig waren dan het muizenadenovirus, uit de virusstam verdwenen.

Het was niet mogelijk met zekerheid aan te tonen dat de kontaminanten waren uitverdund, omdat we niet beschikten over methoden om de zuiverheid van de suspensie te controleren. Wel hebben we met behulp van elektronenmikroskopische opnamen na negatief contrast-kleuring kunnen vaststellen dat in het "gezuiverde" viruspreparaat een groot aantal partikels voorkwamen met de typische adenovirus-morfologie, dat wil zeggen met een diameter van ongeveer 75 nm en een 6-hoekige kontour waarbij op iedere zijde 6 kapsomeren zichtbaar waren. Dit komt overeen met 252 kapsomeren in totaal. De fibers van de viruspartikels waren niet zichtbaar.

De gebruiksvoorraad van muizenadenovirus had na de zuiveringsprocedure in totaal 7 passages in L929-cellen ondergaan. De voorraad werd in kleine hoeveelheden verdeeld over een groot aantal buisjes en werd bewaard bij -60°C om steeds over identieke virusmonsters te kunnen beschikken.

6 EINDPUNTTITRATIES IN BUIZEN

Om het titerverloop van een titratie in buizen na te gaan en de nauw-



Figuur 1 Eindpunttitratie van muizenadenovirus in L929-cellen. Toename van de virustiter bij aflezing op verschillende tijdstippen na enting. Het gemiddelde van 6 titraties en de standaarddeviatie zijn weergegeven.

keurigheid te schatten werd een monster virus 6 maal in buizen met L929-cellen getitreerd. Bij iedere proef werden steeds 6 buizen per 10-voudige verdunning beënt. Twee maal per week werd de titratie afgelezen op grond van het cytopathologische effect. De titers werden berekend volgens de methode van Reed en Muench (1938).

In figuur 1 zijn de resultaten weergegeven. Op ieder tijdstip is het gemiddelde van de zes titraties weergegeven met de standaarddeviatie, steeds in logarithmische eenheden. Na 21 dagen stijgt de (gemiddelde) titer niet verder. Na 25 dagen was de gemiddelde log titer 7.2 ± 0.4 TCID₅₀/ml ("tissue culture infective dose"). Dit wil zeggen dat in 95% van de gevallen de titer zal liggen tussen $10^{6.4}$ en $10^{8.0}$. Dit komt overeen met een concentratieverschil van 40 maal. Deze methode van virustitratie is dus niet alleen langdurig (21 dagen) en bewerkelijk (het medium van de buizen moet vijf maal worden ververs), maar ook onnauwkeurig.

7 PLAQUETEST OP MEF

Voor de plaquetest werd de methode gevolgd die Crawford et al. in 1962 beschreven voor polyomavirus. Hierbij wordt 0,1 ml virussuspensie geënt op een monolayer van sekundaire MEF in een petrischaaltje met een diameter van 6 cm. Het kweekmedium bestond uit Eagle's MEM met 10% geïnactiveerd kalfsserum. Na 2 uur adsorptie wordt 4 ml "overlay" van medium met 0,9% agar toegevoegd. Na 4 dagen wordt nog eens 4 ml "overlay" toegevoegd en 8 dagen na de enting nog eens 4 ml, nu met 0,008% neutraalrood. Weer 4 dagen later verschijnen de plaques, die op achtereenvolgende dagen worden geteld tot hun aantal niet meer toeneemt.

Wij hebben deze methode enkele malen toegepast en inderdaad plaques van muizenadenovirus waargenomen. Het aantal plaques was echter vrij klein in vergelijking met de resultaten van de buisentitraties. De test leek dus ongevoelig te zijn. Verder was deze titratie erg bewerkelijk (3 maal moet een "overlay" worden toegevoegd) en langdurig (15 dagen). Daarom hebben we er verder geen gebruik van gemaakt.

8 TELLING VAN IMMUNOFLUORESCERENDE CELLEN

We hebben gebruik gemaakt van de ervaringen van een vroeger in ons laboratorium verricht onderzoek betreffende de titratie van muizenadeno-

virus door middel van telling van immunofluorescerende cellen (Wouts en van Nieuwstadt, niet gepubliceerd onderzoek) De methode werd door ons verder uitgewerkt en gecontroleerd

8.1 Principe van de methodiek

L929-cellen werden gekweekt in plastic petrischaaltjes (Falcon) met een diameter van 3,5 cm en na 24 uur beënt met 1 ml verdund virus. Het virus kreeg de gelegenheid om gedurende 6 uur te adsorberen. Hierna werden de schaaltes gewassen om niet geadsorbeerd virus te verwijderen en daarna geïnkubeerd bij 36°C. Na een inkubatieperiode van 72 uur werden de cellen gefixeerd met methanol en daarna behandeld met verdund menselijk antiserum. Het menselijk antiserum bestaat uit een door ons bereide pool van patiëntensera met een hoge titer van komplementbindende antistoffen tegen menselijk adenovirus (CBR titer 1:512). Het antiserum liet een goede kruisreactie zien met muizenadenovirus in de fluorescentiereactie, maar niet in de CBR. De titer van de komplementbindingsreactie bij gebruik van muizenadenovirus was slechts 1:8. Hierna werden de schaaltes behandeld met anti-humaan gammaglobuline konjugaat (FITC, Roboz). Na iedere stap werden de schaaltes grondig gewassen. Ze werden tenslotte ingebed met glycerine en met een fluorescentiemikroskoop bekeken. Hierbij werd als lichtbron een hoge druk kwiklamp gebruikt (Osram, type HBO 200), verder een Tiyoda donkerveldkondensor en een excitatiefilter BG 12 en sperfilter 47 (Zeiss). Steeds werden de fluorescerende cellen in 50 gezichtsvelden geteld bij een vergroting van ongeveer 125 maal.

8.2 Invloed van de incubatietijd

Om de optimale incubatietijd te bepalen, namelijk het tijdstip na enting waarop het maximale aantal fluorescerende cellen aanwezig is en waarop nog geen fluorescentie van sekundair geïnfecteerde cellen is opgetreden, werd in een serie van enkele proeven de toename van het aantal fluorescerende cellen in de tijd gevolgd. Alle schaaltes werden tegelijk beënt. Na 4 uur werden ze gewassen. Op verschillende tijdstippen werden schaaltes gefixeerd, steeds 5 per tijdstip. Aan de helft van de schaaltes werd na 48 uur specifiek antiserum tegen muizenadenovirus toegevoegd om het optreden van sekundaire infecties te verhinderen.

Tabel 3 Verband tussen het aantal fluorescerende cellen en de duur van inkubatie van met adenovirus geïnfecteerde L929-cellen

Inkubatieduur (uren)	Aantal fluorescerende cellen ¹⁾	
	Zonder antiserum	Met antiserum ²⁾
36	0	
48	$19 \pm 0,2$	
60	13 ± 3	10 ± 4
72	24 ± 8	23 ± 3
84	36 ± 5	26 ± 5
96	75 ± 21	41 ± 13

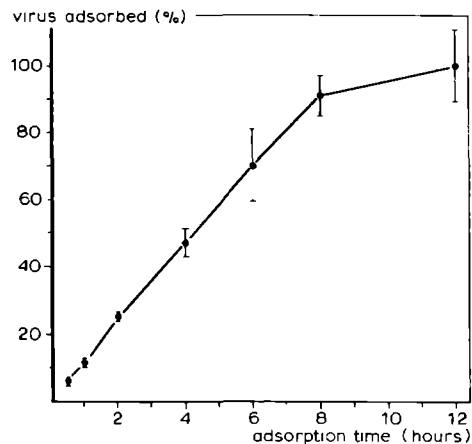
¹⁾ Gemiddelde waarde per gezichtsveld van 5 schaaltes met de standaarddeviatie

²⁾ Cavia-antiserum (eindconcentratie 3%) werd na een inkubatieperiode van 48 uur toegevoegd

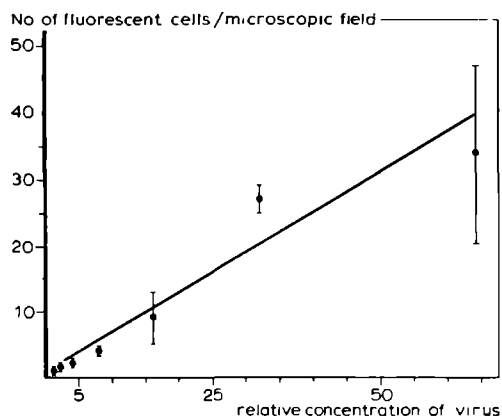
De uitkomsten van een proef die karakteristiek is voor de serie, zijn in tabel 3 weergegeven. Het blijkt dat het aantal fluorescerende cellen toeneemt gedurende de inkubatieperiode. In de kulturen waaraan antiserum is toegevoegd, wordt na ongeveer 72 uur een (tijdelijke) stilstand in toename waargenomen. Na 96 uur is het aantal fluorescerende cellen echter wel weer verder toegenomen (hoewel minder sterk dan in de kulturen zonder antiserum). Dit wijst op 'doorbraak' van het gevormde virus door het antiserum. Op grond van deze uitkomsten hebben wij aanvankelijk een periode van 72 uur beschouwd als een optimale inkubatietijd. In latere proeven bleek echter dat het tijdstip waarop het antiserum werd toegevoegd, namelijk 48 uur na virus-enting, te laat was, omdat er dan al virus in het medium is vrijgekomen.

8.3 Invloed van de adsorptietijd

Om de optimale adsorptietijd te bepalen werd een aantal schaaltes beënt en bij 36°C geïnkubeerd. Op verschillende tijdstippen werden 5 schaaltes



Figuur 2 Verband tussen de duur van de virusadsorptie en het aantal geïnfecteerde cellen, gemeten door middel van immunofluorescentie. Het aantal geïnfecteerde cellen na 12 uur adsorptie is op 100% gesteld. Voor ieder tijdstip is het gemiddelde van 5 schaaltes met de standaarddeviatie gegeven.



Figuur 3. Verband tussen de virusconcentratie en het aantal door middel van immunofluorescentie getelde viruspartikels. Iedere verdunning werd in 5 schaaltes geënt. Het gemiddelde en de standaarddeviatie zijn weergegeven. Lineaire schalen.

uit de stoof gehaald en gewassen. De cellen werden daarna van nieuw medium voorzien en gedurende 72 uur geïnkubéerd, en tenslotte gefixeerd en gekleurd. Het aantal fluorescerende cellen na 12 uur adsorptie werd op 100% gesteld. De uitkomsten van verschillende proeven waren ongeveer gelijk. Een voorbeeld hiervan is in figuur 2 weergegeven. De adsorptie nam vrij sterk toe gedurende de eerste 8 uur van inkubatie. Daarna vlakkt de curve af. Hoewel na 6 uur slechts ongeveer 70% was geadsorbeerd, hebben wij deze tijd uit praktische overwegingen toch als standaard-adsorptietijd gekozen.

8.4. Vergelijking van de gevoeligheid van de buizentitratie en de immunofluorescerende cel-telling

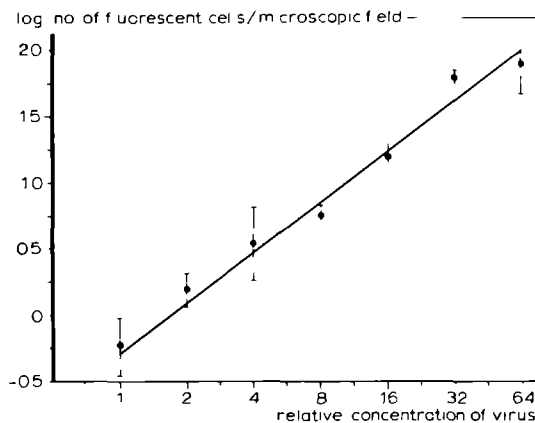
Eenzelfde virussuspensie werd getitreerd door middel van de immunofluorescentie-telmethode en door middel van de eindpunttitratie in buizen. Bij de immunofluorescentie-telmethode werd het virus gedurende 6 uur geadsorbeerd en daarna gedurende 72 uur geïnkubéerd. De suspensie werd 6 maal in beide systemen getitreerd. Het aantal "cell infecting units" dat door middel van de immunofluorescentie-telmethode werd aangetoond, bedroeg gemiddeld $(8 \pm 5) \times 10^5$ eenheden. Door middel van buizentitraties werden gemiddeld $(1,5 \pm 1,0) \times 10^7$ infekterende eenheden aangetoond. De buizentitratie is dus ongeveer 20 maal gevoeliger.

8.5. Dosis-werkingsrelatie

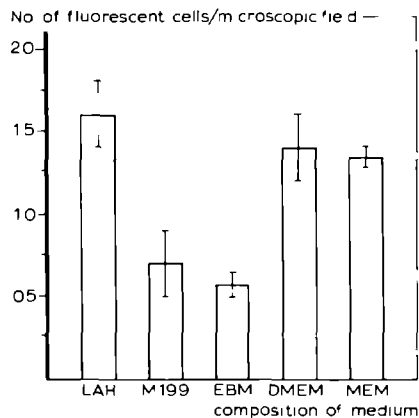
Om na te gaan of de relatie tussen de virusconcentratie en het aantal fluorescerende cellen een lineair verloop heeft, werden verschillende verdunningen van het voorraadvirus geënt in schaalpjes. Voor iedere verdunning werden 5 schaalpjes gebruikt. De uitkomsten van de titraties zijn weergegeven in figuur 3 en 4. Over een 64-voudig concentratieverschil bleek de curve lineair te zijn. Dit is tevens ongeveer het traject waarin de schaalpjes zonder extra hulpmiddelen redelijk telbaar zijn met steeds dezelfde vergroting. Op grond van deze bevinding mogen we aannemen dat één viruspartikel voldoende is voor infectie.

8.6. Nauwkeurigheid van de immunofluorescerende cel-telling

Om de nauwkeurigheid van deze methode te bepalen werd in één experi-



Figuur 4 Dosis-respons curve als fig 3 Logarithmische schalen



Figuur 5 Invloed van de samenstelling van het onderhoudsmedium op de gevoeligheid van de immunofluorescerende cel-telling. LAH Hanks' met 0,5% lactalbumine hydrolysaat, M199 Medium 199, EBM Eagle's basaal medium, DMEM "Dulbecco's modified Eagle's medium", MEM Eagle's "minimum essential medium" Het gemiddelde en de standaarddeviatie van 3 schaaltes zijn weergegeven

ment eenzelfde virussuspensie 5 maal getitreerd in dezelfde batch cellen. Bij iedere titratie werd het virus even sterk verdund. Deze virusverdunding werd op ieder van 5 schaaltes met L929-cellen geënt. De bevindingen zijn weergegeven in tabel 4. Het blijkt uit de uitkomsten dat deze titratietechniek zeer goed reproduceerbaar is.

Tabel 4. Nauwkeurigheid van de immunofluorescerende cel-telling

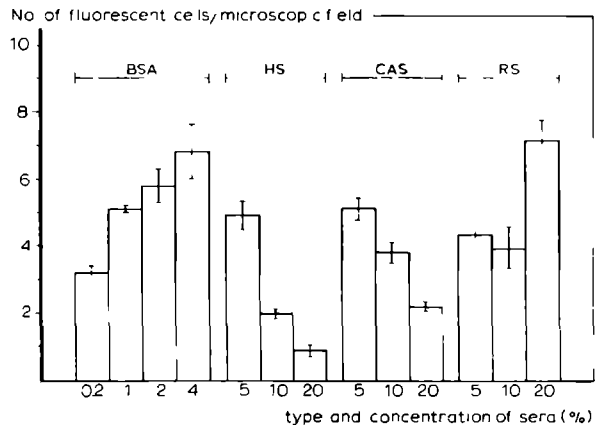
Verduunning no. 1)	Aantal fluorescerende cellen 2)
1	$6,5 \pm 1,1$
2	$7,1 \pm 0,9$
3	$6,6 \pm 1,3$
4	$6,9 \pm 1,3$
5	$6,9 \pm 0,8$
Gemiddeld	$6,8 \pm 0,2$ (3%)

1) Van een virussuspensie werd 5 maal dezelfde verduunning gemaakt en getitreerd.

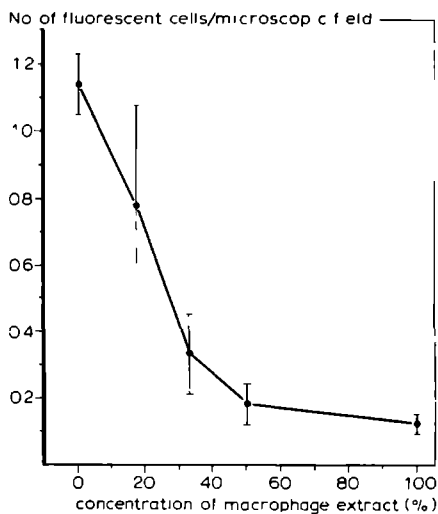
2) Gemiddelde aantal fluorescerende cellen per gezichtsveld van 5 schaaltes met standaarddeviatie. Bij het gemiddelde is ook de variatiecoëfficiënt vermeld.

8.7. Invloed van verschillende factoren op de immunofluorescerende cel-telling

Vanwege de grote mate van nauwkeurigheid leek deze methode goed bruikbaar te zijn, hoewel de gevoeligheid duidelijk lager was dan die van de buzentitraties. Tijdens het onderzoek bleek het echter dat zeer kleine hoeveelheden virus moesten worden aangetoond. Het was derhalve noodzakelijk te beschikken over een gevoelige methode. Wij hebben daarom onderzocht of de gevoeligheid van de immunofluorescentie-telmethode kon worden verhoogd. Verschillende factoren werden opnieuw onderzocht, zoals de samenstelling van het onderhoudsmedium en de soort en concentratie van het serum tijdens de adsorptie. Zoals te zien is in de figuren 5 en 6 is de invloed hiervan niet



Figuur 6 Invloed van soort en concentratie van het serum in het adsorptie-medium op de gevoeligheid van de fluorescerende cel-telling. BSA: bovine serumalbumin, HS: horse serum, CAS: calf serum, RS: rabbit serum. Het gemiddelde en de standaarddeviatie van 3 schuiltjes zijn weergegeven.



Figuur 7 Invloed van makrofagenextract op de gevoeligheid van de immunofluorescerende cel-telling. Het gemiddelde en de standaarddeviatie van 3 schuiltjes zijn weergegeven.

erg groot

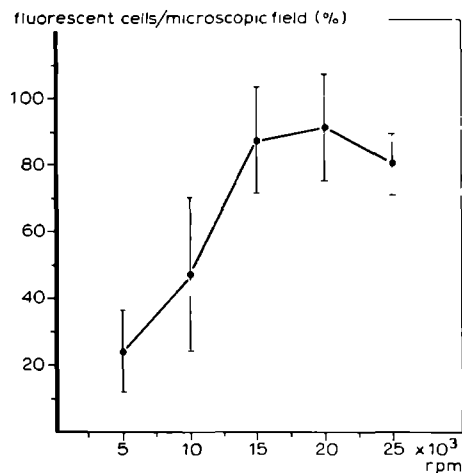
Wij hebben vervolgens nagegaan of de procedure van virusenting, met name de verversing van medium en het afwassen van het virusinokulum na adsorptie, van betekenis was. De uitkomsten van verschillende behandelingswijzen zijn weergegeven in tabel 5. Het bleek dat de gevoeligheid duidelijk kon worden verhoogd door het virus meteen in onderhoudsmedium te verdunnen en het entmateriaal niet te verwijderen en af te wassen.

Tabel 5. Invloed van wassen en verversen van medium na de adsorptieperiode op de gevoeligheid van de immunofluorescerende cel-telling

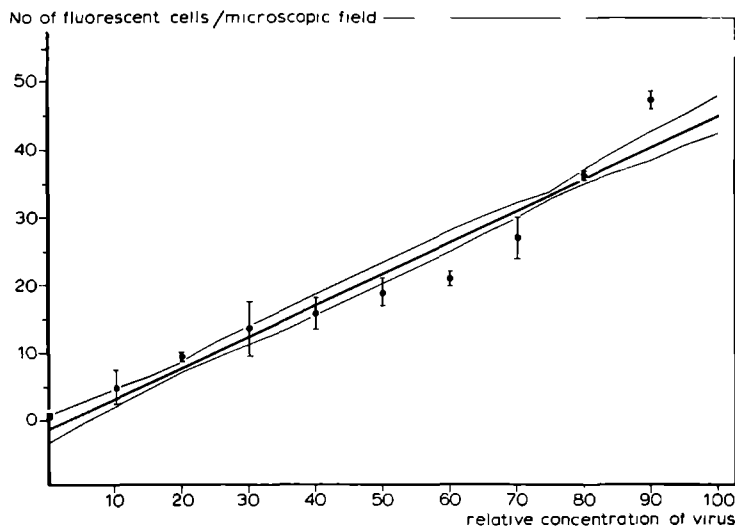
Behandeling na 6 uur adsorptie	Aantal fluorescerende cellen ¹⁾
I Na 3 maal wassen onderhoudsmedium toegevoegd	$4,7 \pm 0,3$
II Entmedium vervangen door onderhoudsmedium	$6,9 \pm 0,6$
III Extra 1 ml onderhoudsmedium toegevoegd	27 ± 1
IV Geen behandeling (virus verdund in onderhoudsmedium)	75 ± 10

1) Gemiddeld aantal fluorescerende cellen per gezichtsveld in 3 schaaltpjes met standaarddeviatie

De moeilijkheid was nu echter dat monsters waarin zich weinig virus bevond, onverdund geënt moesten worden. De monsters werden bereid door cellen door middel van bevroren en ontdooien te vernietigen. Ze bevatten dus een vrij grote hoeveelheid cel-extrakt, dat bij toepassing van de gewijzigde techniek -waarbij verversing en wassen achterwege worden gelaten- gedurende lange tijd in kontakt met de cellen blijft. Om na te gaan of dit van invloed is op de uitkomsten van de titratie hebben wij een extrakt bereid van ongeënte makrofagenkweken en verschillende concentraties hiervan aan een virus-



Figuur 8. Invloed van de snelheid van centrifugeren op de gevoeligheid van de immunofluorescerende cel-telling. Het gemiddelde en de standaarddeviatie van 6 experimenten zijn weergegeven. De hoogste waarde van ieder experiment is op 100% gesteld



Figuur 9 Dosis-respons curve van de immunofluorescerende cel-telling volgens de centrifugemethode. Voor iedere concentratie is het gemiddelde van 3 of 4 glaasjes weergegeven met de standaarddeviatie. De best passende rechte is $y = 0,46x - 1,34$. Korrelatie koëfficiënt $r = 0,965$. Aantal waarneming $N = 37$. Tevens is het 99% betrouwbaarheidsinterval weergegeven.

suspensie toegevoegd. Zoals uit figuur 7 is af te lezen, heeft het celextrakt een sterk remmende invloed op de gevoeligheid van de titratie. Wij hebben verder geen onderzoek gedaan naar de oorzaak van de remmende werking. Het is mogelijk dat dit berust op de inductie van interferon door celextrakt.

8.8. Telling van immunofluorescerende cellen volgens de methode van Hahon

Hahon en medewerkers (Hahon, 1966, Hahon et al, 1973) hebben een methode beschreven om de duur van adsorptie van virus aan cellen te bekrorten en de efficiëntie van adsorptie te verhogen bij titraties door middel van de telling van fluorescerende cellen. De virussuspensie wordt na enting op celmonolayers op een hoog toerental (10 000 rpm gedurende 15 minuten) in een ultracentrifuge gecentrifugeerd. De kansen op contact tussen virus en cel worden op deze wijze aanzienlijk groter. De methode werd toegepast met gele koorts virus en andere arbovirussen en met influenzavirus.

Het leek ons van belang deze methode in ons systeem te testen omdat het medium waarin het virus gesuspenseerd is, onder deze omstandigheden minder kritisch is. L929-cellen werden gekweekt op ronde dekglasjes met een diameter van 15 mm die in speciale autoklaveerbare plastic inzetstukjes geplaatst werden. De inzetstukjes pasten in de buckets van een SW 25 rotor van een Spinco ultracentrifuge. De dekglasjes met L929-cellen werden gekweekt in plastic weefselkweekplaten met 24 kommetjes met een doorsnee van 16 mm (Linbro). Om deze methode zo gevoelig mogelijk te maken en te standaardiseren zijn de optimale draaisnelheid en draaiduur bepaald, alsmede de lineariteit van de dosis-respons kurve en de gevoeligheid en nauwkeurigheid van de titratie.

In tabel 6 kan men zien dat bij centrifugatie op 10 000 rpm en een draaiduur van 20 minuten nog geen optimum gevonden is. Daarom werd nu met een vaste draaiduur van 20 minuten de snelheid gevarieerd. Figuur 8 laat zien dat de optimale snelheid lag bij een toerental van 20 000 rpm. Op grond van deze uitkomsten wordt de adsorptie in het vervolg uitgevoerd met behulp van centrifugatie gedurende 20 minuten op een toerental van 20.000 rpm. De dosis-werkingsrelatie van de op deze wijze gemodificeerde immunofluorescerende cel-telling is weergegeven in figuur 9. Het blijkt dat de kurve in het gehele onderzochte gebied, dat een 90-voudig concentratieverschil omvat, een lineair verloop heeft.

Om de nauwkeurigheid van de titratie te meten werd eenzelfde virussuspensie 5 maal getitreerd. Het virus werd steeds even sterk verdund en deze

Tabel 6 Invloed van de duur van centrifugeren op de gevoeligheid van de immunofluorescerende cel-telling

Tijd (minuten)	Percentage fluorescerende cellen ¹⁾
5	38,5 \pm 5,5
10	60,5 \pm 6,4
15	67,3 \pm 8,4
20	100

- 1) Het gemiddelde en de standaarddeviatie van 3 experimenten zijn weergegeven. Het aantal fluorescerende cellen na 20 minuten centrifugeren van ieder experiment is op 100% gesteld.

virusverdunding werd op ieder van 4 glaasjes met L929-cellen geënt. De bevindingen zijn weergegeven in tabel 7. De uitkomsten van deze titratietechniek zijn evenals die van de oorspronkelijke "stationaire" immunofluorescerende cel-telling goed reproduceerbaar.

Tabel 7 Nauwkeurigheid van de immunofluorescerende cel-telling volgens de centrifuge-methode

Verdunding no ¹⁾	Aantal fluorescerende cellen ²⁾
1	7,5 \pm 0,1
2	6,7 \pm 1,2
3	7,0 \pm 1,1
4	7,7 \pm 1,6
5	8,2 \pm 0,7
Gemiddeld	7,4 \pm 0,6 (8%)

- 1) Van een virussuspensie werd 5 maal dezelfde verdunding gemaakt en getitreerd.
- 2) Gemiddeld aantal fluorescerende cellen per gezichtsveld van 4 glaasjes met standaarddeviatie. Bij het gemiddelde is ook de variatiecoëfficiënt vermeld.

8.9 Vergelijking van de gevoeligheid van de "stationaire" en de volgens Hahon gewijzigde immunofluorescentie-titratie

Eenzelfde virussuspensie werd tegelijkertijd getitreerd volgens de oorspronkelijke methode (8.1) echter zonder wassen (8.7) en volgens de gewijzigde methode (zie 8.8). De proeven werden 3 maal verricht. De uitkomsten zijn weergegeven in tabel 8. Er werd geen duidelijk verschil in gevoeligheid en reproduceerbaarheid tussen beide methoden gevonden.

Tabel 8 Vergelijking van de gevoeligheid van de immunofluorescerende celtelling volgens de stationaire methode met die volgens de centrifugemethode

Experiment no	Aantal cel infekterende eenheden per ml ($\times 10^3$)	
	Stationair	Gecentrifugeerd
1	$3,9 \pm 0,7$ ¹⁾	$4,0 \pm 0,6$
2	$1,3 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,6$
3	$1,5 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,1$

1) Gemiddelde van 3 schaaltes of glaasjes met standaarddeviatie

Het bleek tijdens ons onderzoek dat de gevoeligheid van L929-cellen van proef tot proef wisselde. Dit zou kunnen berusten op veranderingen in de cel-populaties tijdens het kweken. Om de eventuele invloed hiervan zo veel mogelijk te beperken werd een grote hoeveelheid cellen (van dezelfde omzetting) over een groot aantal ampullen verdeeld, bevroren en hierna in vloeibare stikstof bewaard. Voor iedere titratie werd nu een nieuwe ampul ontdooid. De cellen werden vervolgens gedurende 4 dagen in een fles gekweekt. Daarna werden ze getrypsineerd en op dekglasjes gekweekt voor immunofluorescentietitraties. Met deze cellen en met cellen van de L929-celijn die continu werd voortgekweekt, werden op 6 verschillende tijdstippen vergelijkende titraties verricht waarbij steeds dezelfde virussuspensie werd gebruikt. De uitkomsten zijn weergegeven in tabel 9. Het blijkt dat de variabiliteit aanzienlijk kleiner is in de proeven met ontdooidde cellen.

Met deze gewijzigde immunofluorescentie-telmethode beschikken we over

een nauwkeurige en redelijk gevoelige titratiemethodiek die snel (aflezing binnen 3 dagen), zeer nauwkeurig en reproduceerbaar is, wel is ze vrij bewerkelijk

Tabel 9 Onderzoek naar variaties in de gevoeligheid voor adenovirus van kontinu voortgekweekte en gekonserveerde L929-cellen

Experiment no.	Aantal fluorescerende cellen per gezichtsveld ¹⁾	
	Kontinue kweek ²⁾	Ontdooid ³⁾
1	1,5 \pm 0,2	34,1 \pm 0,8
2	42 \pm 4	32 \pm 2
3	26 \pm 5	30 \pm 2
4	7 \pm 2	28 \pm 4
5	30 \pm 4	25 \pm 4
6	13 \pm 4	20,2 \pm 0,9
Gemiddeld	20 \pm 15 (77%)	28 \pm 5 (18%)

- 1) Gemiddelde aantal fluorescerende cellen per gezichtsveld met standaard-deviatie Bij het gemiddelde van de 6 experimenten is ook de variatie-koefficient vermeld
- 2) De cellen werden steeds doorgekweekt en wekelijks werd een gedeelte voor titraties gebruikt
- 3) Van een groot aantal identieke ampullen met cellen, bewaard in vloeibare stikstof, wordt er steeds één ontdooid, na 4 dagen worden de cellen voor titraties gebruikt

9 DISKUSSIE

Volgens de onderzoekers die de FL stam van muizenadenovirus isoleerden (Hartley en Rowe, 1960), ontwikkelt dit virus alleen een CPE in kweken van MEF en SMK-cellen, niet in een reeks andere celkweken, waaronder die van maligne muizeweefsels Volgens Heck et al (1972) veroorzaakt het virus een CPE in muizeniercelkweken. In de cellijn LLC-MK2 die afkomstig is van

nieren van rhesusapen werd geen CPE waargenomen. Van der Veen en Mes (1973) beschreven echter dat muizenadenovirus in L929-cellen kan worden gekweekt en getitreerd. Deze cellijn is afgeleid van een kloon van bindweefsel-fibroblasten van een normale muis. Ook wij maakten met succes gebruik van de L929-cellijn. Het virus groeide in deze cellen tot hoge titers, maar wel langzaam. In buizen die met een geringe hoeveelheid virus zijn geënt ontwikkelt zich pas na ongeveer 20 dagen een CPE. Dit blijkt uit figuur 1. Tot de twintigste dag na enting blijft de titer stijgen.

Crawford (1966) beschreef de isolatie van MVM uit de FL-stam van muizenadenovirus. Verder trof hij er polyomavirus in aan. Of deze twee virussen in ons materiaal voorkwamen, hebben wij met behulp van de toegepaste eenvoudige methoden niet kunnen vaststellen. Hoewel wij geen nauwkeurige kwantitatieve experimenten hebben uitgevoerd, menen wij toch te mogen aannemen dat de beide kontaminerende virussen hoogstens in geringe concentratie aanwezig waren. Voordat wij het muizenadenovirus ontvingen, was het in muizeniercellen (SMK) gekweekt. Polyomavirus kan ook in deze cellen groeien. Van MVM is het niet bekend of het zich in SMK vermenigvuldigt. MVM groeit wel in primaire kweken van muizelongcellen (Parker et al, 1970). Of deze virussen ook in L929-cellen groeien, is niet duidelijk, er ontwikkelt zich in deze cellen echter geen CPE (ongepubliceerde waarnemingen). Mogelijk zijn de beide kontaminanten al na enkele passages in L929-cellen verdwenen. We mogen aannemen dat dit met alle waarschijnlijkheid het geval is na de drie maal herhaalde "terminal dilution"-proeven die wij hebben uitgevoerd.

Of deze kontaminerende virussen in experimenten betreffende de vermenigvuldiging van muizenadenovirus in makrofagen een storende factor zouden kunnen zijn, is niet duidelijk. Misschien zouden ze interferentie-verschijnselen kunnen veroorzaken. Hoewel makrofagen niet gevoelig zijn voor het interferon dat ze zelf produceren (Smith en Wagner, 1967, Allison, 1970), zou er dan toch tijdens de kweek en de titratie van het virus in L929-cellen een storende invloed kunnen optreden. Om een eventueel effect van deze onbekende factoren uit te schakelen, was het van belang het virus zo goed mogelijk te zuiveren.

Verder is in dit verband het zogenaamde "L-cel virus" van belang. Dit virus werd in 1961 beschreven door Dales en Howatson. Het is een C-type oncornavirus, dat in een aantal sublijnen van L-cellen, ook in de L929-sublijnen, voorkomt (Kindig en Kirsten, 1967). Biologische functies van het virus zijn niet bekend. C-type oncornavirussen komen in vele muizeweefsels

voor en hun aanwezigheid tijdens experimenten is moeilijk uit te schakelen

Omdat er in de literatuur slechts spaarzame gegevens voorhanden zijn over titraties met muizenadenovirus is het niet goed mogelijk de door ons ontwikkelde fluorescerende cel-telling te vergelijken met andere titratiemethoden. In vergelijking met de eindpunttitratie in buizen heeft onze methode in ieder geval als voordeel de korte inkubatietijd en verder de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid die vergelijkbaar zijn met die van een plaqueproef. Onze waarnemingen betreffende de langzame adsorptie van muizenadenovirus aan L929-cellen stemmen overeen met die van van Nieuwstadt (1972). Ook hij vond een langzame adsorptie (ongeveer 70% in 6 uur) voor menselijk adenovirus type 2 aan humane embryonale longcellen. Kron et al. (1974) vonden bij proeven met adenovirus type 19 in Hela-cellen ook een zeer langzame adsorptie. Zij zagen ook het hoogste aantal fluorescerende cellen als het inokulum gedurende de gehele inkubatietijd van 48 uur op de cellen bleef.

Omdat de door ons te verrichten experimenten met muizenadenovirus moesten voldoen aan hoge eisen voor wat betreft de gevoeligheid van de test en omdat celextract in onverdund inokulum een ongunstige invloed had op de gevoeligheid, was de enige uitweg bekorting van de adsorptieperiode. Dit werd bereikt door tijdens de adsorptie met hoog toerental te centrifugeren volgens de methode van Hahon (1966). Op deze wijze werd de gevoeligheid van de test vergroot, terwijl de remmende werking van celextract door het korte contact tussen de cellen en het inokulum achterwege bleef.

De gevoeligheid van de fluorescerende cel-telling komt bij van Nieuwstadt (1972) en bij Kron et al. (1974) overeen met die van de eindpunttitratie in buizen. In onze experimenten werd steeds een lagere gevoeligheid van de fluorescerende cel-telling gevonden.

VIRUSVERMENIGVULDIGING IN MAKROFAGEN

1. INLEIDING

Zoals reeds is opgemerkt in hoofdstuk 1, spelen makrofagen waarschijnlijk een belangrijke rol bij de infectie en persistentie van muizenadenovirus in de muis. Om meer inzicht te krijgen in de relatie tussen makrofaag en adenovirus hebben wij in de eerste plaats onderzocht of het virus zich in makrofagen kan vermenigvuldigen en hierin kan persisteren. We gebruikten voor dit onderzoek makrofagen uit de peritoneaalholte, omdat die het gemakkelijkste te verkrijgen en te kweken waren. Om na te gaan of en in welke mate muizenadenovirus zich in makrofagenkweken vermenigvuldigt, werden groeikurven van het virus gemaakt. Ter vergelijking hebben wij ook de groei van twee andere muizenvirussen, polyomavirus en muizenhepatitisvirus (MHV), in ons onderzoek betrokken. Verder hebben wij onderzocht of stimulering van makrofagen invloed heeft op de vermenigvuldiging van virussen in deze cellen.

2. MATERIAAL EN METHODEN

De makrofagen werden verkregen uit de peritoneaalholte van juist volwassen vrouwelijke Swiss muizen ("random bred") die onder konventionele omstandigheden waren gekweekt (Centraal Dierenlaboratorium, Nijmegen en Centraal Proefdieren Bedrijf, T N O., Zeist). De muizen werden met etherdamp gedood. Na desinfectie werd de buikhuid geopend. Daarna werd door de buikwand heen 4 ml Eagle's medium voor suspensiekweken met 2 U heparine per ml en antibiotika in de peritoneaalholte gespoten. Na 10 minuten werd de peritoneaalholte leeg gezogen met een injectiespuit en werd de vloeistof in een gesilikoneerde buis opgevangen. De cellen werden eenmaal gewassen door ze gedurende 10 minuten bij 1000 rpm te centrifugeren en voorzichtig te resuspenderen in nieuw medium. Daarna werden de cellen opnieuw gecentrifugeerd en geresuspenderd in een kleine hoeveelheid kweekmedium, bestaande uit Medium 199 (Gibco) met 0,28 gr bicarbonaat per liter, 20%

geïnactiveerd kalfsserum, 50 U penicilline en 50 , gr streptomycine per ml. De celconcentratie werd met behulp van een haemocytometer bepaald. De celsuspensie werd vervolgens met kweekmedium verdund tot een concentratie van 1 of 2×10^6 cellen per ml en over buizen verdeeld. Iedere buis bevatte 1 ml van deze celsuspensie. De buizen werden afgesloten en in een schuine positie bij 36°C geïnkubeeerd. Na 2 uur werd het medium ververst om de niet gehechte cellen te verwijderen. De gehechte cellen zullen in het vervolg worden aangeduid als makrofagen. We zijn ons echter bewust dat de makrofagenkweken vermoedelijk in geringe mate met andere cellen, zoals polymorf-kernige leukocyten en lymfocyten, verontreinigd zijn. De makrofagenkweken werden verder in schuine positie bij 36°C geïnkubeeerd. Na 72 uur werden ze voor de virologische proeven gebruikt, tenzij anders vermeld.

De herkomst en kweekmethoden van L929-cellen en SMK-cellen die voor titratie van respectievelijk muizenadenovirus en polyomavirus werden gebruikt, zijn in hoofdstuk 2 beschreven. Voor proeven met MHV werden NCTC 1469-cellen gebruikt. De NCTC 1469-cellen werden in 1971 verkregen van de American Type Culture Collection (ATCC). Ze werden gekweekt in NCTC medium 109 (Difco) met 20% geïnactiveerd paardeserum, penicilline en kanamycine (resp. 50 U en 50 , gr per ml). Om de 3 of 4 dagen werd het medium vervangen door vers medium zonder serum. Daarna werden de cellen door flink schudden van de glaswand losgemaakt. Aan de zo verkregen celsuspensie werd nu weer serum toegevoegd, waarna deze over het dubbele aantal flessen werd verdeeld. Na enting van virus werd onderhoudsmedium toegevoegd. Het onderhoudsmedium bevatte 5% kippeserum in plaats van paardeserum.

Muizenhepatitis virus, stam MHV-3, werd in 1969 verkregen van de ATCC. Het virus werd in ons laboratorium vier maal gepasseerd in L929-cellen en daarna twee maal in NCTC 1469-cellen. De titraties van MHV-3 werden uitgevoerd in buizen met NCTC 1469-cellen, waarbij 4 buizen per 10-voudige verdunning werden gebruikt. De titraties werden na 5 dagen afgelezen.

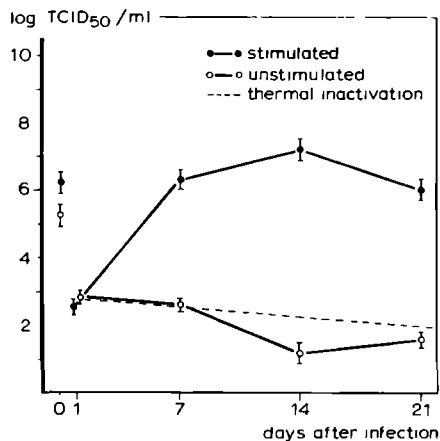
De makrofagenkweken werden steeds gedurende 72 uur geïnkubeeerd voordat ze met virus werden beënt. De kweken werden eenmaal gewassen met PBS-glucose (PBS met 10 gr glucose en 10 mgr fenolrood per liter). Hierna werd 1 ml virussuspensie toegevoegd. Het virus was verdund in kweekmedium voor makrofagen dat in plaats van 20% nu 10% kalfsserum bevatte. Na een adsorptieperiode, waarvan de duur afhankelijk was van het gebruikte

virus, werden de cellen twee maal gewassen om het niet geadsorbeerde virus te verwijderen. Vervolgens werden de beënte kweken bij 36°C geïnkubeerd. Op verschillende tijdstippen na enting werden monsters genomen door steeds 2 of 3 buizen bij -60°C te plaatsen. Na beëindiging van het gehele experiment werden de buizen drie maal bevroren en ontdooid om het virus uit de cellen vrij te laten komen. Daarna werd de inhoud van de buizen die op hetzelfde tijdstip waren geoogst, bijeen gevoegd. Het celdebris werd door centrifugeren verwijderd (10 min. bij 2000 rpm). De bovenstaande vloeistof werd weer bij -60°C bewaard tot het moment van de titratie. Tenzij anders vermeld werden de virustitraties die dienden voor het maken van vermenigvuldigingskurven, uitgevoerd als eindpunttitraties in buizen. Per 10-voudige verdunning werden steeds 4 kulturen beënt. De titraties van muizenadenovirus en polyomavirus werden gedurende 21 dagen aangehouden en twee maal per week ververs. De titraties van MHV-3 werden 5 dagen aangehouden en niet ververs.

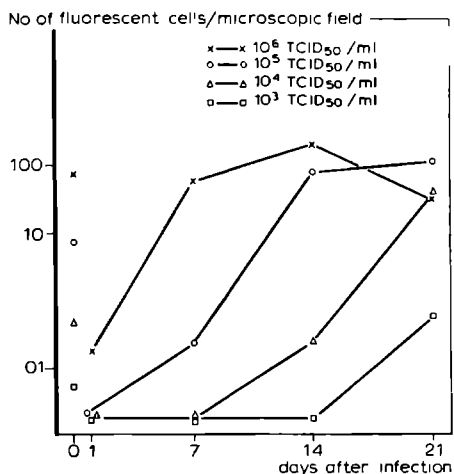
3 VERMENIGVULDIGING VAN MUIZENADENOVIRUS IN NORMALE EN GESTIMULEERDE MAKROFAGEN

3.1 Virusvermenigvuldiging in 3 dagen-oude kweken

Wij hebben eerst groeikurven gemaakt van muizenadenovirus in kweken van normale makrofagen, dat wil zeggen van aan glas gehechte cellen uit de buikholte van normale, onbehandelde muizen. In alle proeven werden vrouwelijke muizen gebruikt. De groeikurven in deze kulturen werden vergeleken met die in kweken van gestimuleerde makrofagen. De laatstgenoemde kweken bestonden uit cellen uit de peritoneaalholte van muizen die drie dagen tevoren intraperitoneaal met 2 ml thioglycollaatmedium (Difco) waren ingespoten. De opbrengst aan cellen per muis wordt hierdoor sterk vergroot, maar tevens verandert het aspect van de cellen in de cultuur. De gestimuleerde cellen hechten zich sneller aan glas en hun cytoplasma is sterk gevaakuoliseerd (Fedorko en Hirsch 1970). We spreken hierbij over stimulatie van makrofagen door intraperitoneaal irriterende stoffen om een onderscheid te maken met de aktivatie van makrofagen die beschreven is in hoofdstuk 1. 1.3 Aktivatie ontstaat onder invloed van endotoxinen of een chronisch ontstekingsproces. Een bespreking van de verschillen in eigenschappen tussen gestimuleerde en geaktiveerde makrofagen wordt gegeven in hoofdstuk 4. In de literatuur bestaat over dit onderwerp veel verwarring, omdat stimulatie en



Figuur 10 Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in met thioglycollaat gestimuleerde en ongestimuleerde makrofagen. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven. De stippellijn geeft de berekende warmte-inactivatie bij 36°C weer.



Figuur 11 Invloed van de multiplicitet van infectie op de vermenigvuldiging van muizenadenovirus in met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen. Het gemiddelde van de telling in 3 schaltjes is weergegeven.

aktivatie van makrofagen niet steeds worden onderscheiden

Bij deze experimenten werd een adsorptietijd van 24 uur gekozen. Meteen na enting werden monsters genomen en verder na 24 uur, wanneer het inokulum door afwassen was verwijderd en op de 7e, 14e en 21e dag. Telkens werd twee maal per week het medium van de kweken ververscht. In figuur 10 zijn de resultaten van deze proeven weergegeven, waarbij steeds de titratieresultaten van vier experimenten zijn samengevoegd, zodat de berekening is gebaseerd op 16 buizen per verdunning. De titers zijn berekend volgens de methode van Reed en Muench (1938). Om een indruk te krijgen van de spreiding van de resultaten zijn de standaarddeviaties uitgerekend volgens de empirische methode van Pizzi (1950). Er werd een opmerkelijk verschil gevonden in virustiters tussen normale en gestimuleerde makrofagenkweken, waarbij de laatste een hoge produktie te zien gaven. De gestimuleerde makrofagenkweken produceerden ongeveer $10^{7.2}$ TCID₅₀ per ml, terwijl in de ongestimuleerde kweken alleen een geleidelijke afname van de titers was te zien. Dit is een verrassend resultaat, daar in de literatuur uitsluitend melding wordt gemaakt van het grotere vermogen van gestimuleerde makrofagen om infekterende mikro-organismen, waaronder ook virussen, af te breken en onschadelijk te maken (Hirsch et al, 1970, Allen en Mudd, 1973).

3.2 Invloed van de leeftijd van makrofagenkweken

De in de vorige paragraaf beschreven experimenten werden uitgevoerd met kweken die op het tijdstip van de virusenting 3 dagen oud waren. Het is mogelijk dat de gevoeligheid van makrofagen tijdens deze periode van kweken in een medium met een relatief hoge konzentratie (20%) van soortvreemd serum verandert. Om dit na te gaan hebben wij enkele experimenten uitgevoerd waarbij de makrofagen meteen na het hechten aan glas en het verwijderen van de niet gehechte cellen met virus beënt werden. De monsters voor virustitratie werden verder op dezelfde tijdstippen genomen, dus meteen na het enten, na 24 uur adsorptie en na 7, 14 en 21 dagen. Deze proeven werden drie maal uitgevoerd, zowel met normale als met thioglycollaatmakrofagen. De samengevoegde resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel 10. In verse kweken van niet-gestimuleerde makrofagen werd geen virusvermenigvuldiging waargenomen, in die van gestimuleerde cellen wel. Vergelijking van deze uitkomsten met die in 3 dagen-oude kweken (figuur 10) laat zien dat het verschil in leeftijd van de kweken niet van invloed was op de mate van virusvermenigvuldiging.

Tabel 10. Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in verse makrofagen-
kweken

Soort Makrofagen	Titer (log TCID ₅₀) op verschillende dagen na enting van adenovirus ¹⁾				
	0 ²⁾	1 ³⁾	7	14	21
Normale makrofagen	5,2	4,5	4,3	4,0	3,2
Thioglycollaatmakrofagen	5,5	3,8	4,0	7,3	8,6

1) Gemiddelde van 3 experimenten

2) Meteen na het enten

3) Na afwassen van het inokulum

3 3 Invloed van de multiplicitéit van infectie

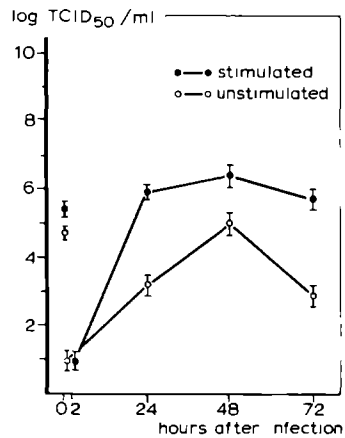
In enkele experimenten werd onderzoek verricht naar de invloed van de multiplicitéit van infectie op het verloop van de groeikurven van het virus in kweken van thioglycollaatmakrofagen. Een groot aantal kulturen van gestimuleerde makrofagen werd 72 uur na het aanleggen beënt met muizenadenovirus in verschillende concentraties, respectievelijk 10^3 , 10^4 , 10^5 en 10^6 TCID₅₀. Op dezelfde tijdstippen als die van de voorgaande proeven (3 1) werden weer monsters van 2 of 3 buizen genomen. De titraties van deze monsters werden uitgevoerd met de immunofluorescerende cel-telling volgens de stationaire methode, zoals beschreven in hoofdstuk 2 8 1. Alle titraties werden met dezelfde batch cellen uitgevoerd, met 3 schaaltes per virusmonster. De resultaten van een van de experimenten zijn als voorbeeld weergegeven in figuur 11. Uit de figuur blijkt, dat in kulturen die met een lagere concentratie virus zijn beënt, de virusvermenigvuldiging wat later op gang komt. Bij een inokulum van 10^6 TCID₅₀ is de multiplicitéit van de infectie ongeveer 2, omdat van de 10^6 cellen die in kweek werden gebracht, ongeveer de helft aan glas hecht. We nemen aan dat in dit geval vrijwel alle gevoelige cellen meteen worden geïnfecteerd. Bij een lagere multiplicitéit zijn hiervoor één of meer infectiecykli nodig, zodat de maximale virustiter later bereikt wordt. De makrofagen lijken tijdens de langdurige inkubatie wel gevoelig te blijven voor infectie. De late titerstijging bij zeer lage multiplicitéit

3 4 Immunofluorescentie in makrofagen

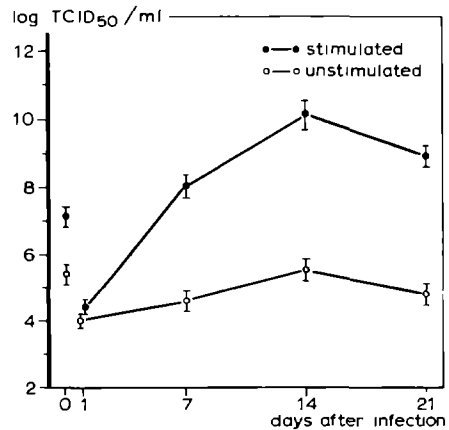
Met behulp van de immunofluorescentiereactie kunnen virusantigenen in cellen zichtbaar gemaakt worden. Wij hebben deze techniek gebruikt om te trachten na te gaan welk percentage van de makrofagen in een met muizenadenovirus beënte kweek was geïnfecteerd. Daartoe werden normale en thio-glycollaatmakrofagen op dekglasjes gekweekt en beënt met 10^6 TCID₅₀ virus per kultuur. Meteen na het enten en vervolgens 2 maal per week werden er enkele glasjes gewassen met PBS, gefixeerd met methanol, behandeld met verdund menselijk antiserum en daarna voor immunofluorescentie gekleurd, zoals beschreven is in hoofdstuk 2 8 1. Daarna werden de glasjes bekeken met de fluorescentiemikroscoop. Tegen de verwachting in werd in geen enkel preparaat immunofluorescentie waargenomen. De oorzaak hiervoor zou kunnen zijn dat er per makrofaag heel weinig virus geproduceerd wordt. Het is ook denkbaar dat er in makrofagen, in tegenstelling tot L929-cellen en SMK-cellen, bijzonder weinig virusantigenen gevormd worden die kruisreacties geven met het menselijke antiserum. De laatstgenoemde verklaring lijkt echter minder waarschijnlijk.

3 5 Warmte-inaktivatie van muizenadenovirus

De langzame daling van de titer van muizenadenovirus in geïnfecteerde kweken van normale, niet gestimuleerde makrofagen (figuur 10) zou uitsluitend het gevolg kunnen zijn van warmte-inaktivatie. Het is echter ook mogelijk dat het verloop van de curve mede wordt beïnvloed door eventuele intracellulaire overleving van virus of misschien zelfs door geringe virus-vermenigvuldiging. Om dit te beoordelen hebben wij onderzoek gedaan naar de snelheid van inaktivering van muizenadenovirus in de warmte. Omdat de aanwezigheid van cellen op zich reeds een conserverende werking zou kunnen hebben, werden de proeven verricht in buizen met culturen van gestimuleerde makrofagen die echter voor gebruik één maal werden bevroren en ontdooid om de cellen te doden. Hierna werden per kultuurbuis 10^6 TCID₅₀ muizenadenovirus toegevoegd. Vervolgens werden de buizen bij 36°C geplaatst. Om de 3 of 4 dagen werden er 2 buizen bij -60°C gezet. Na 21 dagen werden alle monsters 3 maal bevroren en ontdooid en om het celdebris te verwijderen werden ze gedurende 10 minuten bij 2000 rpm gecentrifugeerd. De boven-



Figuur 12 Vermenigvuldiging van MHV-3 in met thioglycollaat gestimuleerde en ongestimuleerde makrofagen. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven.



Figuur 13 Vermenigvuldiging van polyomavirus in met thioglycollaat gestimuleerde en niet gestimuleerde makrofagen. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven.

staande vloeistof werd onverdund getitreerd in L929-cellen met behulp van de immunofluorescerende cel-telling met de centrifugemethode (hoofdstuk 2 8 8) Per tijdstip werden 2 of 3 glaasjes geteld

De logarithme van het gemiddelde aantal fluorescerende cellen in 50 gezichtsvelden van ieder glaasje werd uitgezet tegen de tijd Met behulp van de methode van de kleinste kwadraten werd de best passende rechte door deze punten berekend Op grond van deze rechte kan de halfwaardetijd van het virus bij een temperatuur van 36°C worden geschat op ongeveer 8 dagen Dit houdt in dat de log titer in 27 dagen met 1 afneemt Om de betekenis van dit gegeven duidelijk te maken is de inaktivatie van het virus als een stippellijn aangegeven in figuur 10 Men ziet dat de virustiters in de niet gestimuleerde makrofagenkweken aanvankelijk gelijk zijn aan de titers die volgens de inaktivatiecurve worden verwacht Na 2 en 3 weken zijn de titers in de makrofagenkweken echter lager Dit zou kunnen berusten op een snellere inaktivatie van virus binnen de makrofaag Het medium van de makrofagenkweken werd twee maal per week ververscht waardoor het in de vloeistof aanwezige virus sterk werd verdund Dit heeft echter slechts weinig effect op de uiteindelijke virustiter omdat -als we aannemen dat virusreplikatie van muizenadenovirus net zo verloopt als die van menselijke adenovirussen- slechts ongeveer 2-6% van de gevormde virionen in het kweekmedium vrijkomen Op grond van de bevindingen betreffende de warmte-inaktivering van muizenadenovirus mogen we dus aannemen dat het virus zich zeer waarschijnlijk niet vermenigvuldigt in kweken van normale makrofagen en hierin evenmin langer overleeft

4 VERMENIGVULDIGING VAN POLYOMAVIRUS EN MHV-3 IN NORMALE EN GESTIMULEERDE MAKROFAGEN

Om na te gaan of het grote verschil in virusproductie tussen gestimuleerde en normale makrofagen een specifieke eigenschap is van muizenadenovirus, werden ook groeicurven gemaakt van enkele andere virussen Wij hebben hiervoor twee virussen gekozen, respectievelijk polyomavirus dat evenals muizenadenovirus een DNA virus is dat zich in de kern vermenigvuldigt, en muizenhepatitisvirus, stam MHV-3, een RNA virus De proeven werden op dezelfde wijze verricht als die met muizenadenovirus met uitzondering van de tijdstippen van oogsten

In figuur 12 zijn de resultaten van de experimenten met MHV-3 weergegeven De adsorptietijd was 2 uur. Omdat MHV-3 een snel groeiend virus is,

zijn de monsters in deze proeven meteen na enting genomen en verder na 2 uur (nadat het inokulum was afgewassen) en na 24, 48 en 72 uur. De resultaten van vier experimenten zijn weer samengevoegd. Zoals uit de figuur blijkt, is er wel een verschil in virusproductie te zien. Het verschil is echter niet zo groot als in de proeven met muizenadenovirus. In de gestimuleerde makrofagenkweken werd ongeveer 24 maal zo veel virus geproduceerd als in de ongestimuleerde.

De resultaten van de proeven met polyomavirus zijn in figuur 13 weergegeven. De adsorptietijd was 24 uur. De monsters werden op dezelfde tijdstippen genomen als in de proeven met muizenadenovirus, omdat polyomavirus zich langzaam vermenigvuldigt. In de ongestimuleerde kweken werd weliswaar een duidelijke virusproductie waargenomen, maar deze was veel kleiner dan die in de gestimuleerde kweken. De opbrengst in de laatstgenoemde kweken was ongeveer 40.000 maal groter dan die in de ongestimuleerde kweken. De hoge virusproductie in gestimuleerde makrofagen bleek dus geen specifieke eigenschap van muizenadenovirus te zijn. Ook de beide andere onderzochte virussen vermenigvuldigden zich sterker in gestimuleerde cellen. Dit was vooral duidelijk in de proeven met polyomavirus, veel minder duidelijk in die met MIV-3.

5 INVLOED VAN ANDERE WIJZEN VAN STIMULATIE EN AKTIVATIE OP DE VIRUSVERMENIGVULDIGING

Nadat was vastgesteld dat de hoge virusproductie in gestimuleerde makrofagen geen specifieke eigenschap was van muizenadenovirus, hebben we onderzocht of het verschijnsel een speciale eigenschap van de thioglycollaatstimulatie was. Met het oog hierop hebben we kweken gemaakt van makrofagen die afkomstig waren van muizen die op verschillende manieren waren voorbehandeld. Hierbij werden onder meer methoden toegepast waarvan het bekend is dat hierdoor makrofagen worden gestimuleerd. Steeds werd onderzocht of en in welke mate muizenadenovirus zich in deze kweken vermenigvuldigde. In enkele experimenten werd ook de gevoeligheid van de kweken voor polyomavirus gemeten.

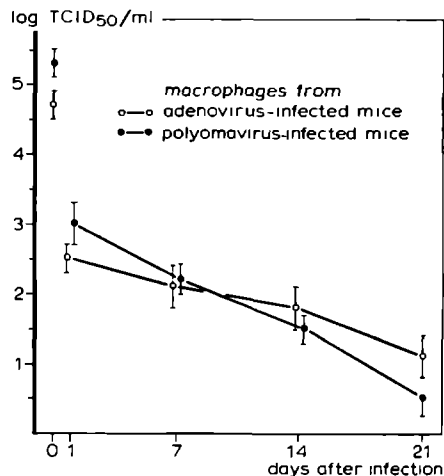
5.1. Akute infectie met adenovirus

Eerst hebben we een onderzoek gedaan naar het effect van een acute virusinfectie. Het leek ons van belang na te gaan of makrofagen misschien tijdens

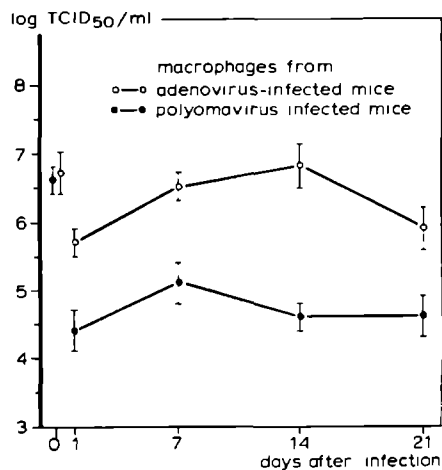
een akute virusinfektie "permissive" worden voor de vermenigvuldiging van virussen, die zich normaal niet in de makrofaag vermenigvuldigen. Gekozen werd voor een intranasale infectie, niet voor een intraperitoneale infectie om het peritoneum niet kunstmatig door de injectie te prikkelen. De muizen kregen intranasaal 10^3 TCID₅₀ muizenadenovirus of 10^6 TCID₅₀ polyomavirus toegediend. De geïnfecteerde muizen werden in isolatoren geplaatst, waarin een onderdruk aanwezig was om verspreiding van het virus en kruisinfecties te verhinderen. Een week later werden kweken van makrofagen van deze muizen gemaakt en beënt met virus. De wijze waarop de kweken werden aangelegd, het tijdstip van virusenting, de duur van adsorptie en de tijdstippen waarop materiaal voor virustitraties werd geoogst, waren gelijk aan die in de proeven met door thioglycollaat gestimuleerde makrofagen. Er werden groeikurven gemaakt voor muizenadenovirus en polyomavirus. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in figuur 14 en 15. Wanneer we de gegevens van figuur 14 vergelijken met die van figuur 10, dan blijkt dat de gevoeligheid van makrofagen voor muizenadenovirus niet verandert tijdens de akute fase van de virusinfektie, althans niet op het door ons gekozen tijdstip. In de makrofagenkweken van geïnfecteerde muizen is een geleidelijke daling van de titers van het hierin geënte muizenadenovirus te zien. Hetzelfde patroon was waargenomen in ongestimuleerde kweken van makrofagen van normale muizen (figuur 10). De gevoeligheid van makrofagen voor polyomavirus verandert evenmin tijdens een akute virusinfektie. Een vergelijking van de figuren 13 en 15 laat zien dat er in makrofagen van zowel geïnfecteerde als normale muizen een geringe vermenigvuldiging van polyomavirus plaats vindt.

5.2 Persisterende infectie met adenovirus

We hebben vervolgens een onderzoek gedaan naar de gevoeligheid van makrofagen voor muizenadenovirus bij muizen waarbij een persisterende infectie met muizenadenovirus was geïnduceerd. De muizen werden intranasaal met 10^3 TCID₅₀ muizenadenovirus geïnfecteerd. Ze werden in isolatoren geplaatst. Drie maanden later werden uit de peritoneaalholte makrofagen geoogst. We mogen aannemen dat op dit tijdstip een persisterende infectie met adenovirus aanwezig is, waarbij het virus in vrij hoge concentratie in de urine wordt aangetroffen (van der Veen en Mes, 1973). Kweken van de geoogste makrofagen werden beënt met muizenadenovirus en polyomavirus. Voor deze proef werden dezelfde methoden toegepast die ook voor de experi-



Figuur 14 Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in makrofagen van muizen die 7 dagen tevoren met adenovirus of polyomavirus zijn geïnfecteerd. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven.



Figuur 15 Vermenigvuldiging van polyomavirus in makrofagen van muizen die 7 dagen tevoren met adenovirus of met polyomavirus zijn geïnfecteerd. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten zijn weergegeven met de standaarddeviatie.

menten met makrofagen van muizen tijdens de akute fase van virusinfekties waren gebruikt (5 1). Bovendien hebben wij nagegaan of thioglycollaat effect had. Drie dagen voor het oogsten van makrofagen werd intraperitoneaal 2 ml thioglycollaatmedium ingespoten. Overigens was er geen verschil met de hierboven vermelde proefopzet.

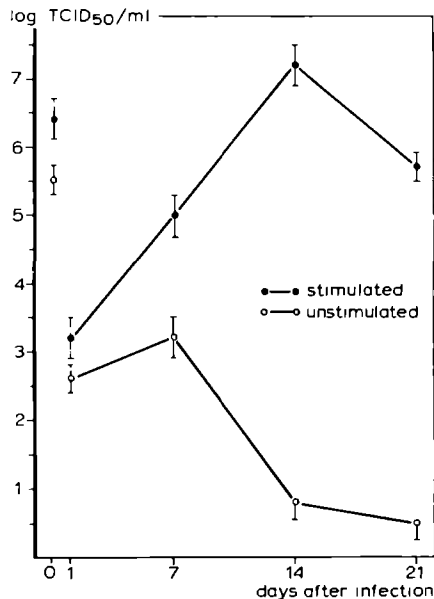
De resultaten van deze proeven zijn weergegeven in figuur 16 en 17. De gegevens moeten ook weer vergeleken worden met die van figuur 10 en 12. Het blijkt dat de persisterende infectie met adenovirus de gevoeligheid van peritoneale makrofagen voor muizenadenovirus en polyomavirus niet veranderde, evenmin als een akute adenovirusinfectie. De titers van muizenadenovirus namen af, terwijl er een geringe vermenigvuldiging van polyomavirus optrad. Stimulatie met thioglycollaat verhoogde de gevoeligheid. In gestimuleerde makrofagenkweken werden grote hoeveelheden muizenadenovirus en polyomavirus gevormd, evenals het geval was met kweken van gestimuleerde makrofagen van normale muizen. We vonden dus geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van "immune" makrofagen noch op de 7^e dag van de infectie noch 3 maanden later. Met "immune" makrofagen bedoelen we makrofagen die een specifiek verhoogde of verminderde gevoeligheid bezitten voor het virus waarmee het dier (waarvan de makrofagen afkomstig zijn) geïnfecteerd was.

5.3 Toediening van Toxoplasma, BCG, endotoxine en kalfs serum

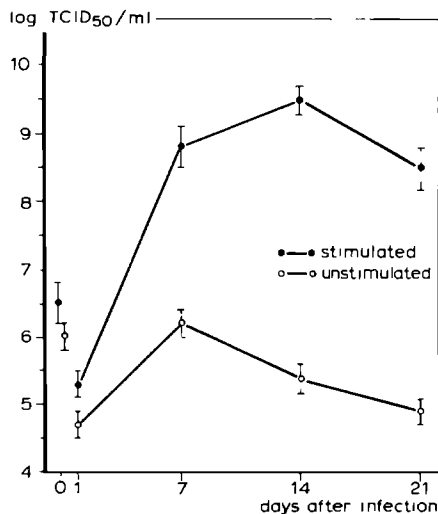
Inleiding

Uit de literatuur is het bekend dat bij chronische infectie met *Toxoplasma gondii* en bij vaccinatie met BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) de makrofagen geactiveerd kunnen worden, tegelijk met het ontwikkelen van de cellulaire immuniteit. Enkele publikaties over de activering van makrofagen worden hieronder vermeld.

Muizen met een chronische *Toxoplasma* infectie bleken gedurende tenminste 7 maanden na het begin van de infectie resistent te zijn tegen een gewoonlijk letale dosis *Salmonella typhimurium* of *Listeria monocytogenes* (Ruskin en Remington, 1968). Verder waren met *Toxoplasma* geïnfecteerde muizen gedurende tenminste een jaar gedeeltelijk beschermd tegen mengovirus (Remington en Merigan, 1969). Hibbs et al. (1971, 1972) vonden dat chronische *Toxoplasma* infectie bij muizen bescherming gaf tegen ontwikke-



Figuur 16 Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in met thioglycollaat gestimuleerde en niet gestimuleerde makrofagen van muizen met een persisterende adenovirus-infectie. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven.



Figuur 17 Vermenigvuldiging van polyomavirus in met thioglycollaat gestimuleerde en niet gestimuleerde makrofagen van muizen met een persisterende adenovirusinfectie. De gekombineerde resultaten van 4 experimenten met de standaarddeviatie zijn weergegeven.

ling van tumoren. In vitro onderzoek toonde aan dat dit verschijnsel vermoedelijk veroorzaakt werd door geactiveerde makrofagen. Het bleek dat makrofagen van de geïnfecteerde muizen cytotoxisch waren voor getransformeerde fibroblasten, echter niet voor normale muizecellen.

Soortgelijke waarnemingen zijn beschreven voor BCG. Blanden et al (1969) onderzochten of muizen die met BCG waren gevaccineerd, resistent werden tegen *Listeria* of *Salmonella typhimurium*. Werden de muizen gevaccineerd met een lage dosis (ca 10^4 levende bacteriën), dan werd geen verhoogde resistentie waargenomen, echter wel als ongeveer 2 weken later een tweede, grotere dosis BCG werd gegeven. Na deze reïnfectie of na één grote dosis van ca 10^8 bacteriën nam het mikrobicide vermogen van makrofagen toe. Dit bleek uit de versnelde fagocytose en intracellulaire "killing" van met opsoniserende antistoffen behandelde *Salmonella typhimurium*. Mackaness (1970 a) heeft een overzicht gegeven van de gebeurtenissen bij de ontwikkeling van cellulaire immuniteit na vaccinatie met BCG. Hierin wordt onder meer gewezen op het ontstaan van geactiveerde makrofagen. Hibbs (1974) toonde aan dat makrofagen van muizen die met BCG waren gevaccineerd, cytotoxisch waren voor tumorcellen. Dit is een eigenschap van geactiveerde makrofagen.

Makrofagen kunnen ook op andere wijze worden geactiveerd. Zo is door verschillende onderzoekers gewezen op de invloed van endotoxinen op makrofagen. Old et al (1961) beschreven dat toediening van endotoxinen aan muizen de gevoeligheid voor mengovirus deed afnemen. Dit kan het gevolg zijn van de inductie van interferon door endotoxine, maar ook van stimulering van het mononukleaire fagocyten systeem. Wanneer muizen werden ingespoten met bacteriële lipopolysacchariden, werden binnen 48 uur geactiveerde makrofagen in de peritoneaalholte gevonden (Nelson, 1972). Makrofagen die door endotoxine geactiveerd waren, bleken factoren te vormen die de transformatie van lymfocyten remmen (Nelson, 1973). Verder kunnen endotoxinen, evenals infecties met *Toxoplasma* en BCG, muizen beschermen tegen ontwikkeling van tumoren (Yang en Nowotny, 1974) wat ook weer wijst op aktivering van makrofagen. Daarentegen vonden Shands et al (1974) geen geactiveerde makrofagen in de peritoneaalholte van muizen na toediening van bacteriële lipopolysacchariden. Integendeel de cellen toonden een cytotoxisch effect. Mogelijk is dit afwijkende effect van endotoxine te wijten aan verschillen in bereiding, dosis en/of interval tussen toediening van het endotoxine en het isoleren van de peritoneale cellen. Een "dosis-effect" van lipopolysacchariden komen we in de literatuur meer tegen. Wiener en Levanon (1968) vonden dat mononukleaire fagocyten uit de peritoneaalholte van muizen door lage concentraties

lipopolysacchariden werden geactiveerd wat zich uitte in een verhoogd gehalte aan hydrolytische enzymen. Bij hogere doses was er echter een cytotoxisch effect waarneembaar

Verder willen wij in dit verband nog wijzen op het effect van kalsserum. Van Furth et al (1973) hebben beschreven dat na een intraperitoneale injectie bij muizen van serum van pasgeboren kalveren het aantal makrofagen in de peritoneale holte toenam, doordat hierin meer monocysten uit het perifere bloed binnenstroomden. Ook in het bloed werd een groter aantal monocysten gevonden in vergelijking met de waarden bij normale muizen. Dit werd veroorzaakt door een snellere produktie van mononukleaire fagocyten in het beenmerg

Methodiek

Wij hebben vervolgens experimenten uitgevoerd om na te gaan of de bovengenoemde methoden om makrofagen te activeren of te stimuleren ook invloed uitoefenden op de gevoeligheid van makrofagen voor adenovirus. Eerst wordt een korte beschrijving gegeven van de toegepaste behandelingen

(1) Chronische infectie met *Toxoplasma gondii*

Muizen werden intraperitoneaal geïnfecteerd met ca. 10 trofozoieten van de stam Deelen in fysiologisch zout. Deze stam wordt in het laboratorium aangehouden door de parasieten om de 3 of 4 dagen intraperitoneaal in muizen te passeren. De stam Deelen veroorzaakt een dodelijke infectie in de muis. Ter bescherming tegen het letale effect werd van de 3e tot en met de 17e dag na infectie sulfadiazine in het drinkwater toegediend in een concentratie van 400 mgr/l. Drie of meer weken na de infectie werden makrofagen in kweek gebracht

(2) Infectie met *Mycobacterium bovis*, stam BCG

Muizen werden intraveneus geïnfecteerd met ca. 10^4 levende bacteriën (lyofiel gedroogd vaccin, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven). Het gerekonstitueerde vaccin werd verdund in PBS met 0,2% bovine serum albumine. Na 21 dagen werden de dieren opnieuw geïnfecteerd, nu met ca. 10^5 bacteriën. Twee dagen later werden makrofagenkweeken van deze muizen gemaakt

(3) Toediening van bacteriële lipopolysacchariden

Wij volgden de aanwijzingen van Nelson (1973). Muizen ontvingen een subkutane dosis van 200 µgr lipopolysaccharide (W) van *E. coli* 055 B5 (Difco). Het lipopolysaccharide werd gesuspenderd in PBS. Twee dagen na de injectie werden makrofagenkweeken van de dieren gemaakt

(4) Toediening van nuchter kalfs-serum

Muizen werden intraperitoneaal met 1 ml geïnactiveerd serum ingespoten. Drie dagen later werden makrofagenkweken aangelegd.

De makrofagenkweken van de muizen die op de hierboven genoemde wijze waren voorbehandeld, bevatten 10^6 cellen per kultuur. Ze werden na 72 uur beënt met 10^6 TCID₅₀ muizenadenovirus. Er werden monsters genomen en getitreerd zoals beschreven en 3-1. De experimenten werden 3-6 maal uitgevoerd. De resultaten van de experimenten zijn weergegeven in tabel 11. De uitkomsten van een soort experiment zijn steeds samen geteld.

Tabel 11 Vermenigvuldiging van muizenadenovirus in kweken van makrofagen van op verschillende manieren voorbehandelde muizen

Voorbehandeling van muizen	Titer (log TCID ₅₀) op verschillende dagen na enting van adenovirus				
	0 ¹⁾	1 ²⁾	7	14	21
Chronische Toxoplasma infectie	3,6	<1	<0,5	<0,5	<0,5
BCG infectie en -reinfectie	3,6	<1	<0,5	<0,5	<0,5
Subkutane toediening van E. coli endotoxine	5,9	3,5	3,9	<1	<0,5
Intraperitoneale toediening van nuchter kalfs-serum	6,2	3,8	4,8	3,7	5,5

1) Meteen na het enten

2) Na afwassen van het inokulum

Alleen in makrofagen van muizen die met kalfs-serum waren voorbehandeld, is virusvermenigvuldiging waargenomen. De virusproductie was echter veel geringer dan die in thioglycollaatmakrofagen (zie figuur 10). Het is niet geheel zeker of de virusproductie op een werking van het kalfs-serum berust, omdat ook bij enkele experimenten met normale makrofagen van onbehandelde muizen een geringe virusvermenigvuldiging werd gevonden. Endotoxine had geen duidelijk effect.

Het was opvallend dat er in makrofagenkweken van met Toxoplasma en

BCG voorbehandelde muizen vanaf de eerste dag na enting geen virus kon worden aangetoond. Zelfs in de kulturen die meteen na enting waren ingevroren, werd weinig virus teruggevonden. Dit zou kunnen berusten op een virucide werking van de makrofagen. Het is echter niet uitgesloten dat het verschijnsel ook of misschien uitsluitend het gevolg was van een veranderde gevoeligheid van de L929-cellen waarin de titraties werden uitgevoerd. De gevoeligheid hiervan was namelijk laag toen deze titraties werden verricht. Wij hebben daarom opnieuw de gevoeligheid van makrofagen van voorbehandelde muizen onderzocht, nu voor polyomavirus. Het gebruik van polyomavirus had als voordeel dat de titer van dit virus in makrofagenkweken hoger was dan die van muizenadenovirus, zodat een eventuele titerdaling langer gevolgd kon worden. De muizen werden voorbehandeld met BCG of nuchter kalfs-serum. De resultaten van de proeven zijn in tabel 12 weergegeven.

Tabel 12 Vermenigvuldiging van polyomavirus in kweken van makrofagen van op verschillende manieren voorbehandelde muizen

Voorbehandeling van muizen	Titer (log TCID ₅₀) op verschillende dagen na enting van polyomavirus				
	0 ¹⁾	1 ²⁾	7	14	21
BCG infectie en -reinfectie	6,9	5,0	4,6	4,4	3,0
Intraperitoneale toediening van nuchter kalfs-serum	7,4	4,5	5,9	5,6	5,3

1) Meteen na het enten

2) Na afwassen van het inokulum

De uitkomsten moeten worden vergeleken met die van normale makrofagen van onbehandelde muizen. Zowel in normale makrofagen als in makrofagen van met kalfs-serum voorbehandelde muizen vindt een duidelijke -zij het geringe- virusvermenigvuldiging plaats. Daarentegen ziet men in makrofagen van met BCG behandelde muizen een voortdurende titerdaling. Na 21 dagen is de titer in deze kulturen ongeveer 200 maal lager dan die in de proeven met kalfs-serum. We zien dus eenzelfde trend bij de experimenten met

polyoma- en muizenadenovirus een verminderde virusopbrengst in makrofagen van met BCG behandelde muizen in vergelijking met die in normale makrofagen. Deze bevindingen wijzen er dus inderdaad op dat het virucide vermogen van makrofagen toeneemt onder invloed van vaccinatie met BCG.

6 IN VIVO-PROEVEN MET THIOGLYCOLLAAT

Makrofagen van met thioglycollaat behandelde muizen zijn in vitro gevoeliger voor adenovirus (en andere virussen). Op grond hiervan is het denkbaar dat toediening van thioglycollaat ook in vivo waarneembare gevolgen heeft op het verloop van de infectie. Behandelde muizen zouden misschien gevoeliger zijn voor infectie. Met het oog hierop hebben wij in enkele experimenten het effect van thioglycollaat op de gevoeligheid van muizen voor adenovirusinfectie onderzocht.

In ieder experiment werden twee groepen van 20 muizen gebruikt, met een leeftijd van 3 weken. Een groep werd intraperitoneaal met 2 ml thioglycollaat ingespoten, een andere groep bleef onbehandeld. Na 3 dagen werden beide groepen intraperitoneaal geïnfecteerd met een grote dosis adenovirus ($10^{7,5}$ TCID₅₀ per muis). Na de infectie werden de muizen in isolatoren geplaatst. Gedurende 3 weken werd naar eventuele sterfte gekeken. Dit experiment werd 2 maal uitgevoerd. In beide experimenten was er een geringe sterfte (2/20) in de onbehandelde groep. Van de behandelde muizen stierf er geen. Er werden ook geen ziekteverschijnselen waargenomen. Wij hebben dit experiment nog 3 maal herhaald met muizen van 8 weken. De dieren kregen een intraperitoneale dosis van $10^{8,5}$ TCID₅₀ adenovirus. Bij deze proeven trad in het geheel geen ziekte of sterfte op.

Op dezelfde wijze hebben wij ook onderzocht of thioglycollaat invloed uitoefent op het verloop van infectie met polyomavirus. Het leek ons van belang ook met dit virus proeven te verrichten omdat het in vitro-effect van thioglycollaat ten opzichte hiervan nog duidelijker was. Er werden drie experimenten uitgevoerd, steeds op dezelfde wijze. Hierbij werden muizen van 8 weken gebruikt, die intraperitoneaal werden ingespoten met 10^8 TCID₅₀ polyomavirus per muis. Ook bij deze experimenten werd geen sterfte of ziekte onder de muizen waargenomen.

Er kon dus geen effect van thioglycollaat op het in vivo-verloop van virusinfecties worden aangetoond. In tegenstelling tot de verwachting gaf thioglycollaat enige bescherming tegen adenovirusinfectie. Het effect werd echter

alleen waargenomen bij jonge muizen en was niet significant. Het is denkbaar dat bij herhaling van de proeven met een groter aantal muizen of bij proeven met nog jongere muizen wel een duidelijk beschermend effect zou zijn gevonden. Wij zijn hier echter niet verder op ingegaan.

7 DISKUSSIE

Over de vermenigvuldiging van virussen in makrofagen is vrij veel gepubliceerd, echter niet over de vermenigvuldiging van muizenadenovirus. Alleen Eustatia (1971) vermeldt dat hij geen vermenigvuldiging kon aantonen. Dit gegeven is niet in tegenspraak met onze resultaten, daar hij waarschijnlijk ongestimuleerde makrofagen gebruikt heeft en de geïnfecteerde kweken slechts vier dagen aanhield. Na vier dagen vonden wij zelfs in de thioglycolaatmakrofagen slechts een geringe titerdaling.

Omtrent de vermenigvuldiging van de andere in ons onderzoek gebruikte virussen zijn iets meer literatuurgegevens beschikbaar. Mallucci (1969) en Mallucci en Taylor-Papadimitriou (1973) vonden geen vermenigvuldiging van polyomavirus in makrofagen. Zij namen wel tijdelijke morfologische veranderingen van de makrofagen waar, echter geen transformatie, maar wel een verhoogde cellulaire DNA-synthese en vorming van een tumor-antigeen. Daarentegen vermeldde Mauel en Defendi (1971) in de discussie van hun artikel dat polyomavirus in hun experimenten cytocide voor makrofagen was. Zij gebruikten dezelfde muizenstam als Mallucci en Taylor-Papadimitriou, namelijk stam C57Bl. De verklaring voor deze kontroverse is waarschijnlijk dat Mallucci makrofagen van onbehandelde muizen gebruikte, terwijl Mauel en Defendi de muizen voorbehandelden met een zetmeelinjectie. Deze verklaring is afgeleid uit de resultaten van onze experimenten. In kweken van normale, ongestimuleerde makrofagen vonden wij een geringe vermeerdering van polyomavirus en geen effect op de cellen. In kweken van met thioglycolaat gestimuleerde makrofagen werd steeds een grote hoeveelheid virus gevormd en lieten de cellen tijdens de langdurige inkubatie van de glaswand los. Dat Mallucci en Taylor-Papadimitriou in het geheel geen virusvermenigvuldiging waarnamen, is waarschijnlijk te wijten aan de omstandigheid dat zij de experimenten te vroeg beëindigden, voordat virusvermenigvuldiging kon worden aangetoond.

Verscheidene publikaties maken melding van de vermenigvuldiging van muizenhepatitisvirussen in makrofagen, o.a. van MHV-3 (Vainio en Judah,

1962, Allison en Mallucci 1965 en Mallucci 1965, 1966) Alleen Eustatia et al. (1972) hebben een vergelijkend onderzoek verricht met normale en gestimuleerde makrofagen. Zij vonden een verschil in virusproductie tussen kweken van normale en met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen, mits de cellen meteen na het in kweek brengen werden beënt. Bij enting na 72 uur was er nauwelijks nog verschil. De thioglycollaatmakrofagen produceerden meer virus dan de normale. In onze experimenten met MHV-3 werd ook een vrij klein verschil in virusproductie gevonden.

Over het effect van stimulatie op de gevoeligheid van makrofagen voor andere virussen zijn slechts spaarzame gegevens voorhanden. Hirsch et al. (1970) beschreven dat makrofagen van volwassen muizen die intraperitoneaal met proteose-pepton waren ingespoten, de in vitro verspreiding van herpes simplex virus beter tegenhielden dan normale makrofagen. Makrofagen van zeer jonge muizen (5-6 dagen) die met proteose-pepton waren behandeld, reageerden echter nog niet op deze wijze. Shayegani et al. (1974) deden een onderzoek naar de vermenigvuldiging van influenzavirus in makrofagen van muizen die kort tevoren herhaalde malen waren ingespoten met *Staphylococcus aureus* en met een bakteriofagenlysaat van *Staphylococcus aureus*, tengevolge waarvan de makrofagen werden geactiveerd. Het bleek dat -in vergelijking met normale makrofagen van onbehandelde muizen- van de geactiveerde makrofagen een duidelijk kleiner percentage cellen werd geïnfecteerd. Dit werd aangetoond door middel van immunofluorescentie- en hemadsorptiereacties. De productie van infectieus virus werd niet gemeten. Uit een onderzoek van Rager-Zisman en Allison (1973) bleek eveneens dat met proteose-pepton gestimuleerde makrofagen minder gevoelig waren voor Coxsackie B-3 virus dan normale makrofagen. Dit werd aangetoond door middel van de "infective center assay". Verder bleek de virustiter in kweken van gestimuleerde makrofagen sneller af te nemen dan op grond van warmte-inaktivatie kon worden verwacht.

Er zijn in de literatuur wel een groot aantal mededelingen verschenen over de invloed van verschillende makrofaag-aktiverende behandelingen op virusinfekties in vivo. Een aantal van deze onderzoeken werd oorspronkelijk opgezet om de invloed van interferon op het verloop van de virusinfektie na te gaan. Vaak kon er echter geen interferon worden aangetoond. Wel werd steeds een verhoogde resistentie van het proefdier gevonden. Dit was het geval bij infekties met mengovirus (Old et al, 1961, Remington en Merigan, 1969, Billiau et al, 1971, Muyembe et al, 1972) en vacciniavirus (Billiau et al, 1970, Allen en Mudd, 1973, de Clercq en de Somer, 1973). Budzko en

Kiersenbaum (1973) wijzen op het beschermende effect van endotoxine op ziekte door Junin virus bij muizen, maar het is niet duidelijk of de bescherming veroorzaakt wordt door aktivering van makrofagen of juist door remming van de immunologische afweer of misschien door beide mechanismen. De ziekteverschijnselen bij infecties met Junin virus worden namelijk veroorzaakt door de immunologische reactie van de gastheer op het virus. Zo kunnen muizen door neonatale thymectomie beschermd worden tegen de ziekte door Junin virus. Neonatale thymectomie veroorzaakt naast remming van de immunologische reactie ook aktivatie van makrofagen (Takeya et al, 1968). Welk effect het meest naar voren treedt, is niet duidelijk. Zo is het evenmin mogelijk aan te geven op welke wijze endotoxine bij Junin virus infecties werkt.

Uit proeven van Shayegani et al (1974) bij muizen bleek dat door *Staphylococcus aureus* geaktiveerde makrofagen een geringe bescherming gaven tegen infectie met influenzavirus, de sterfte was vertraagd. Dat het beschermende effect slechts gering was, wijten de auteurs aan de grote virulentie van de door hen gebruikte virusstam. In andere proeven werd aangetoond dat jonge muizen tegen het letale effect van een infectie met herpes simplex of Cocksackie B-3 virus konden worden beschermd door een injectie met makrofagen van adulte dieren. Bij de experimenten met herpes simplex virus werd bovendien vermeld dat door proteose pepton gestimuleerde makrofagen een grotere mate van bescherming gaven dan normale (Hirsch et al, 1970, Rager-Zisman en Allison, 1973).

Wij vonden geen aanwijzingen dat "immune" makrofagen, in casu makrofagen van dieren die tevoren met adenovirus waren geïnfecteerd, een andere gevoeligheid voor adenovirus hadden als makrofagen van niet geïnfecteerde dieren. Dit stemt overeen met de uitkomsten van proeven met "bovine viral diarrhea-mucosal disease virus", in makrofagen van immune runderen werd evenveel virus gevormd als in die van niet immune dieren (Truitt en Schechmeister, 1973).

Daarentegen zagen andere onderzoekers wel een verschil in gevoeligheid tussen "immune" en "niet immune" makrofagen. Zo zouden makrofagen van immune muizen meer ectromeliavirus vormen dan die van niet immune muizen (Roberts, 1964). Aangezien bij deze proeven alleen de immunofluorescentiereactie werd toegepast, is dit geen absoluut bewijs. Het verschil zou ook kunnen berusten op de aanwezigheid van een grotere hoeveelheid virusantigenen in de cellen tengevolge van een grotere opname van viruspartikels. In proeven met dengue virus is wel duidelijk aangetoond dat de virusproductie

in "immune" cellen is verhoogd (Halstead et al, 1973). Bij deze experimenten werd gebruik gemaakt van kweken van leukocyten van immune apen. De onderzoekers schrijven de verhoogde produktie toe aan de aanwezigheid van cytofiële antistoffen op "immune" makrofagen, waardoor deze cellen erg gevoelig voor het virus zouden kunnen worden

Andere onderzoekers vonden juist het omgekeerde: een verminderde produktie van virus in makrofagen van immune dieren. Dit werd aangetoond voor vacciniavirus in proeven bij konijnen (Avila et al, 1972) en bij muizen (Ueda en Nozima, 1973), en verder voor influenzavirus bij muizen (Shayegani et al, 1974) In de proeven met vacciniavirus bij muizen werd dit verschijnsel alleen waargenomen bij enting met een lage multiplicitet

De resultaten van proeven met verschillende virus-makrofaag systemen zijn dus niet eensluidend voor wat betreft de invloed van de immuniteit van de donor van de makrofagen. Alle drie effecten die theoretisch mogelijk zijn, werden waargenomen: verhoging, verlaging en gelijkblijven van de gevoeligheid

Hoewel er al veel onderzoek is gedaan naar de invloed van makrofagenstimulatie en -aktivatie op het verloop van virusinfekties in vivo en in vitro, zijn er nog veel onduidelijkheden. Weinig onderzoekers vinden een verhoging van de gevoeligheid van gestimuleerde of geactiveerde makrofagen, zoals wij hebben aangetoond in proeven met door thioglycollaat gestimuleerde makrofagen voor wat betreft muizenadenovirus, polyomavirus en in mindere mate MHV-3. De waarnemingen van Roberts (1964) en Eustatia et al. (1972) en de hypothese van Halstead et al. (1973) wijzen in deze richting. Verder kan men door vergelijking van de gegevens van Mallucci (1969) met die van Mauel en Defendi (1971) tot dezelfde konklusie komen. Onze waarnemingen tonen aan dat door stimulatie van makrofagen de gevoeligheid van deze cellen voor sommige virussen wordt verhoogd.

METING VAN DE STIMULATIE EN AKTIVATIE VAN MAKROFAGEN

1 INLEIDING

Na intraperitoneale stimulatie van muizen met thioglycollaatmedium worden makrofagen gevormd die, zoals in hoofdstuk 3 is beschreven, in vitro grote hoeveelheden muizenadenovirus en polyomavirus kunnen produceren. Dit bleek een bijzondere eigenschap van door thioglycollaat gestimuleerde cellen te zijn. Op andere wijzen gestimuleerde of geactiveerde makrofagen produceerden niet meer virus dan makrofagen van normale onbehandelde muizen. Wij wilden nu nagaan of er nog meer eigenschappen zijn, waarin thioglycollaatmakrofagen zich onderscheiden van normale en op andere manieren gestimuleerde peritoneale makrofagen.

Er zijn in de literatuur vele mededelingen gedaan over onderzoek naar eigenschappen van geactiveerde of gestimuleerde makrofagen. De eigenschappen worden meestal vergeleken met die van normale makrofagen. Mededelingen over vergelijkend onderzoek van makrofagen die op verschillende wijze zijn geactiveerd, komt men zelden tegen. Slechts enkele van de vele publicaties over eigenschappen van geactiveerde makrofagen worden hieronder vermeld. Het doel van deze inleiding is vooral de aandacht te vestigen op de verschillende methoden die zijn toegepast.

1.1 Fagocytose en afbraak

Blanden et al. (1969) hebben de fagocytose en "killing" van bacteriën gemeten in makrofagen van normale en met BCG gevaccineerde muizen. Ze gebruikten hiervoor *Salmonella typhimurium*. Een moeilijkheid bij dit soort experimenten is dat de fagocytose in vitro zo langzaam verloopt, dat er niet genoeg levende bacteriën in de cellen aanwezig zijn om de afname van hun aantal nauwkeurig te meten (van Furth en van Zwet, 1973). Indien makrofagen echter in vivo met de bacteriën in contact komen, verloopt de fagocytose zeer snel. De testbacteriën worden daarom in vivo toegevoegd. Na korte tijd

worden de makrofagen geoogst en in kweek gebracht, en op gezette tijden wordt het aantal intracellulair overlevende bacteriën geteld. Op deze wijze is ook de fagocytose en "killing" van *Salmonella typhimurium* onderzocht. Het bleek dat na vaccinatie met BCG de intracellulaire "killing" sneller plaats vond mits het vaccin twee maal werd toegediend. Op soortgelijke wijze is aangetoond dat ongeveer 8 dagen na infectie van muizen met ectromelia en lymfocyttaire choriomeningitisvirus de intracellulaire "killing" versterkt was (Blanden en Mims, 1973). Bij deze experimenten werd *Listeria monocytogenes* als indikator voor de fagocytose en "killing" gebruikt. Een akute virusinfectie kan dus blijkbaar makrofagen aktiveren.

Ook andere soorten bacteriën zijn als indikator gebruikt, zoals *Staphylococcus aureus* (Whaley en Sing, 1973) en *Escherichia coli* (Gadeberg et al, 1975). Verder wordt de fagocytose ook wel gemeten aan de hand van het aantal geopsoniseerde schapenerythrocyten dat opgenomen wordt (Levy en Wheelock, 1975), of op grond van de degradatie van met ^{125}I gelabelde antigeen-antistofcomplexen (Gadeberg et al, 1975). Van Furth en van Zwet (1973) hebben nauwkeurige aanwijzingen gegeven voor de uitvoering van fagocytose-experimenten met muizemakrofagen. Kritische opmerkingen bij de technieken die gebruikt worden voor de meting van de intracellulaire "killing" van bacteriën, zijn door D'Arcy Hart (1974) gemaakt. Voegt men aan de testkulturen geen antibiotika toe, dan is de extracellulaire vermenigvuldiging van de bacteriën die na het afwassen zijn overgebleven, een probleem. Deze kunnen namelijk gefagocyteerd worden, waardoor het aantal intracellulaire levende bacteriën tijdens het experiment nog kan stijgen. Voegt men wel antibiotika toe, dan kunnen deze soms ook intracellulair bacteriën doden, waardoor een te hoog percentage "killing" gevonden wordt.

Gallily en Eliahu (1974) hebben de fagocytose en afbraak van een polypeptide-antigeen door met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen vergeleken met die door normale makrofagen. Het antigeen was met ^{125}I gelabeld. In de gestimuleerde cellen werd een hoger gehalte aan lysosomale enzymen aangetroffen. Toch bleef de afbraak van het antigeen in de gestimuleerde makrofagen achter bij die in normale cellen. Dit was ook het geval met de opname van dit antigeen.

De verhoogde virusproduktie in thioglycollaatmakrofagen zou kunnen samenhangen met een verandering in hun vermogen tot fagocytose en afbraak van partikels. Het leek ons van belang na te gaan of thioglycollaatmakrofagen in deze eigenschappen verschilden van makrofagen die op andere wijze waren

gestimuleerd Omdat wij bij deze experimenten evenals bij de proeven met virus gebruik wilden maken van 3 dagen-oude kweken, waren de hierboven beschreven experimenten met bacteriën, waarbij de bacteriën reeds in vivo werden toegediend, niet toepasbaar Wij hebben daarom gebruik gemaakt van de suggestie van Kölsch (1970) om in plaats van bacteriën bacteriofagen te gebruiken Dit heeft als voordeel dat het goed omschreven kwantificeerbare partikels zijn, die zich tijdens het experiment niet vermengvuldigen Bovendien zijn ze zeer thermostabiel, waardoor het aantal tijdens de proef konstant blijft.

1.2 DNA-synthese

Het is ook mogelijk de aktiviteit van het DNA-syntheseproces van makrofagen te meten. Dit kan men doen door toepassing van radio-actief gelabeld thymidine Zowel de totale hoeveelheid ingebouwde ^3H -thymidine per kultuur als het aantal gelabelde cellen kunnen worden bepaald. Van normale makrofagen toont slechts een klein aantal DNA-synthese (Keast en Birnie, 1969) Dit aantal neemt toe indien de makrofagen met polyomavirus worden geïnfecteerd (Mallucci, 1969, Mallucci en Taylor-Papadimitriou, 1973) of indien de muizen waarvan de makrofagen afkomstig zijn, van tevoren met thioglycollaat worden ingespoten (Keast en Birnie, 1972)

Van Furth et al. (1973) vonden dat van de makrofagen in de peritoneale holte van normale muizen een klein aantal DNA synthetiseerde. Dit aantal bleef ongeveer konstant bij een akute ontsteking. Deze auteurs veronderstellen dat de cellen met actieve DNA-synthese uit het bloed komen. Zij achten intraperitoneale hervatting van de DNA-synthese niet bewezen Indien de makrofagen in vitro werden gekweekt, nam het aantal cellen dat ^3H -thymidine inkorporeerde, snel af van 3,5% meteen na het in kweek brengen tot bijna 0% na 18 uur

Verder zijn er een aantal mededelingen gedaan over een toename van de DNA-synthese en de mitosefrequentie van makrofagen in vitro onder invloed van gekonditioneerd medium. Hiermee wordt een normaal weefselkweekmedium aangeduid, waarin enige tijd muizefibroblasten gegroeid hebben. Volgens sommige auteurs vindt deze verhoging van de DNA-synthese alleen plaats wanneer makrofagen gebruikt worden die door thioglycollaat zijn gestimuleerd (Lin en Stewart, 1973, Stewart et al, 1975) Anderen vermelden niet of de muizen werden voorbehandeld (Mauel en Defendi, 1971) of dienen

zetmeel intraperitoneaal toe om meer makrofagen te verkrijgen (Jacoby en Lee, 1969) Ook van longmakrofagen van normale muizen is beschreven dat ze groeien in aanwezigheid van gekonditioneerd medium (Soderland en Naum, 1973) Celvrij ontstekingsexsudaat zou hetzelfde effect hebben als gekonditioneerd medium (Wynne et al, 1975, Adolph et al, 1975) Bij het begin van de ontwikkeling van cellulaire immuniteit worden vaak makrofagen in mitose waargenomen (overzicht Nelson, 1972) Gedetailleerd onderzoek hierover werd verricht door North (1969) In muizen die met *Listeria monocytogenes* werden geïnfecteerd, steeg het percentage DNA-synthetiserende peritoneale makrofagen van 0,5% bij het begin van het experiment tot 14% 2 dagen na de infectie Op dit tijdstip was ook een meetbare cellulaire immuniteit ontstaan.

Op grond van bovengenoemde gegevens lijkt het toch wel waarschijnlijk dat stimulatie met thioglycollaat het vermogen van makrofagen DNA te synthetiseren en te delen doet toenemen Aktiviteit van het DNA-syntheseprocess in de celkernen is mogelijk van belang voor de vermenigvuldiging van virussen Speciaal voor DNA-virussen die zich binnen de kern vermenigvuldigen, lijkt dit waarschijnlijk Inderdaad is het van enkele DNA-virussen bekend dat ze beter groeien in actief delende cellen (Parker et al, 1970)

Wij hebben daarom gespekuleerd dat de oorzaak voor de sterk verhoogde virusproduktie in met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen moet worden gezocht in de grotere aktiviteit van het DNA-syntheseprocess in deze cellen Ondersteunend voor deze spekulatie is de waarneming dat juist de produktie van de twee onderzochte DNA virussen het sterkst door thioglycollaat werd verhoogd Om deze veronderstelling te toetsen hebben wij een vergelijkend onderzoek gedaan naar de DNA-synthese in kweken van makrofagen van muizen die met thioglycollaat waren gespoten, en van muizen die andere voorbehandelingen hadden ondergaan

2 MATERIAAL EN METHODEN

De verschillende manieren van stimuleren van makrofagen en het verzamelen van de cellen werden in het vorige hoofdstuk beschreven. De makrofagen werden echter op een andere wijze gekweekt, namelijk op dekglasjes die geplaatst werden in plastic weefselkweekplaten (Linbro) met 24 kommetjes met een diameter van 16 mm. Dit had als voordeel dat we nu in staat waren om direkt een aantal glasjes te fixeren en te kleuren om het aantal cellen te bepalen De platen werden geïnkubeed in een CO₂-stoof met 5% CO₂ in lucht, bij 36°C en 98% relatieve vochtigheid Het medium van de

kweken werd aan deze omstandigheden aangepast. Er werd per liter 0,56 gr bicarbonaat toegevoegd in plaats van 0,28 gr.

T7 bakteriofagen en *Escherichia coli* B werden in 1974 verkregen van de American Type Culture Collection. De bacteriën werden gekweekt in buizen met bouillonagar. De bakteriofagen werden gekweekt en getitreerd volgens de methoden van Adams (1959).

^3H -thymidine met een specifieke aktiviteit van 5 Ci/mmol werd betrokken van het Radiochemical Centre (Amersham, England).

3 FAGOCYTOSE EN INAKTIVATIE VAN T7 BAKTERIOFAGEN DOOR THIO-GLYCOLLAATMAKROFAGEN

Van de T7 bakteriofagen werd eerst een grote voorraad gekweekt en gesteriliseerd door millipore-filtratie. De virussuspensie werd in kleine porties verdeeld en bij -60°C bewaard om steeds over identieke monsters te kunnen beschikken. De makrofagen werden, zoals beschreven, op dekglasjes gekweekt. Steeds werden $0,5 \times 10^6$ thioglycollaatmakrofagen of 1×10^6 makrofagen van normale of op andere wijze voorbehandelde muizen per kweek gebruikt. Aan het medium van de kweken werd als enig antibioticum penicilline toegevoegd om de groei van de voor streptomycine gevoelige colibacteriën tijdens de titraties van de bakteriofaagmonsters niet te remmen. Na 2 uur werden de niet gehechte cellen verwijderd. Na 3 dagen werden de kweken voor de fagocytoseproeven gebruikt.

In een aantal oriënterende experimenten werden de meest geschikte proefomstandigheden en tijden van monsternamen onderzocht. In de eerste experimenten werden 10^6 PFU ("plaque forming units") T7 bakteriofagen per kultuur geënt. Zowel de afname van de totale hoeveelheid infectieus virus per kweek als het verloop van de hoeveelheid intracellulair virus werden gemeten. Hierbij bleek de langzame fagocytose van het virus een probleem te zijn. Daarom werden enkele veranderingen in de methode aangebracht om de fagocytose te bevorderen. Er werd 20% niet geïnactiveerd en zo vers mogelijk kalfsserum gebruikt in plaats van 10% geïnactiveerd kalfsserum. Verder werd de sterkte van het inoculum vergroot, in plaats van 10^6 bakteriofagen in 1 ml werden 20×10^6 fagen in 0,2 ml toegediend. Bovendien werd in plaats van de afname van de virustiter in het medium de toename van de hoeveelheid intracellulair virus gemeten. De adsorptie- en fagocytosetijd bedroeg 2 uur. Uit voorproeven was gebleken dat deze periode het meest geschikt was. Hierna werden de glaasjes uit de weefselkweekplaten genomen en grondig gewassen.

(6 maal in PBS-glucose) Meteen na het wassen werd het eerste monster genomen. Ieder monster bestond uit drie dekglasjes met makrofagen. Vervolgens werd ieder uur opnieuw een monster van drie glasjes genomen. De glasjes werden in nieuw medium voor makrofagen geplaatst. Om het virus uit de cellen vrij te maken werden ze drie maal bevroren en ontdooid. Hierna werden de monsters gecentrifugeerd (10 min 2000 rpm) om het celdebris te verwijderen en getitreerd op bouillonagar-platen met E. coli B. Per virus-verdunning werden drie platen gebruikt.

Met behulp van deze methodiek hebben wij nu de fagocytose en inaktivatie van T7 fagen gemeten in kweken van makrofagen van normale en voorbehandelde muizen. Steeds werden 3 dagen-oude kweken gebruikt. Voor de berekening en weergave van de resultaten is gebruik gemaakt van de methoden die door van Furth en van Zwet (1973) zijn aangegeven. In plaats van de afname van het extracellulaire virus hebben wij echter de hoeveelheid intracellulair virus na de adsorptietijd van 2 uur gemeten. Dit geeft een iets vertekend beeld, omdat er geen rekening wordt gehouden met de bakteriofagen die binnen de adsorptietijd zijn gefagocyteerd en reeds geïnactiveerd. Voor het gemak laten we dit buiten beschouwing. De fagocytose-index wordt weergegeven door de volgende formule

$$F_{120} = \log N_{120}$$

waarbij F_{120} de fagocytose-index is over 120 minuten die gelijkgesteld wordt aan de logaritmie van het aantal infectieuze viruspartikels dat na 120 minuten intracellulair kan worden aangetoond.

De "killing" index is

$$K_{60} = \log N_0 - \log N_{60}$$

De "killing" index over 60 minuten wordt dus gelijkgesteld aan de logaritmie van het aantal intracellulaire bakteriofagen op tijdstip 0 minus de logaritmie van het aantal fagen op tijdstip 60 minuten. Daarbij wordt het tijdstip waarop het eerste monster werd genomen (meteen na het wassen) als tijdstip 0 gekozen. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel 13. Het gemiddelde van 6 experimenten per soort makrofagen is gegeven. Uit de tabel blijkt dat zowel de fagocytose als de inaktivatie van T7 bakteriofagen in gekweekte makrofagen door geen van de toegepaste voorbehandelingen significant werden veranderd ten opzichte van de makrofagen van normale muizen.

Tabel 13 Fagocytose en inaktivatie van bakteriofaag T7 door makrofagen van op verschillende manieren voorbehandelde muizen

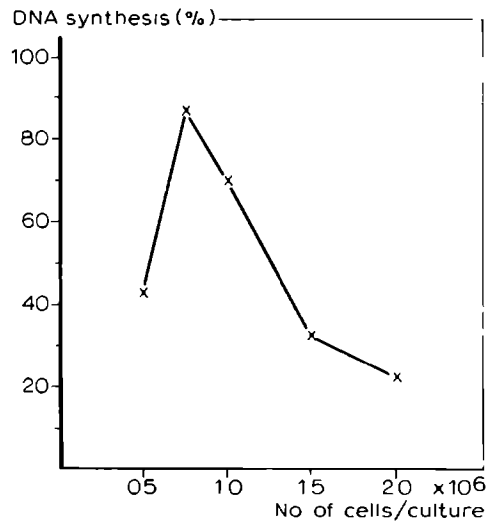
Voorbehandeling van muizen 1)	Fagocytose 2)	p 3)	Inaktivatie 4)	p
Geen	3,41	—	1,03	—
Thioglycollaat	3,15	ns	0,99	ns
BCG	2,96	ns	1,53	$5 < p < 10\%$

- 1) Thioglycollaat werd intraperitoneaal toegediend, BCG twee maal intraveneus
- 2) Fagocytose index $\cdot F_{120} = \log N_{120}$, gemiddelde van 6 experimenten per voorbehandelingsmethode
- 3) t-toets voor twee steekproeven ns geen significant verschil met normale makrofagen. $p > 10\%$
- 4) Inaktivatie index $K_{60} = \log N_0 - \log N_{60}$

4. DNA-SYNTHESE DOOR THIOGLYCOLLAATMAKROFAGEN

Ook voor de meting van de DNA-synthese door makrofagen in vitro werden de makrofagen op dekglasjes gekweekt. Makrofagen van muizen die met thioglycollaat, endotoxine of nuchter kalfsserum waren voorbehandeld, werden vergeleken. Van iedere soort werden 2×10^6 en 1×10^6 cellen per kweek gebruikt. Na 2 uur werden de niet gehechte cellen verwijderd. Drie dagen na het aanleggen van de kweken werden de cellen voorzien van nieuw medium met 10% kalfsserum (in plaats van 20% kalfsserum) en met $10 \mu\text{Ci } ^3\text{H-thymidine}$ per ml. Na 24 uur werden de kweken gewassen met PBS-glucose om de niet ingebouwde thymidine te verwijderen en daarna gefixeerd met methanol gedurende twee maal 20 minuten. De glasjes werden daarna met de cellen naar boven in telpotjes geplaatst met 5 ml scintillatievloeistof (4 gr PPO en 0,25 gr dimethyl POPOP in 1 liter tolueen) en gedurende 5 minuten in een Packard Tricarb Scintillation Counter geteld. Van iedere soort makrofagen werden enkele niet gelabelde glasjes met Giemsa gekleurd voor de telling van het aantal cellen. Hiertoe werden het aantal cellen per gezichtsveld en het aantal gezichtsvelden per glasje bepaald bij 1000 maal vergroting. Daarna werd de labeling per 10^5 cellen berekend.

Uit oriënterende experimenten, vooral uit de proeven met thioglycollaat-



Figuur 18. Invloed van het aantal cellen in een kweek van met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen op de DNA-synthese. De inkorporatie van ^3H -thymidine is gemeten. Het gemiddelde van 5 experimenten is weergegeven. De hoogste waarde van inkorporatie van ieder experiment is op 100% gesteld.

makrofagen, bleek dat herhaaldelijk in kulturen met meer cellen minder ^3H -thymidine werd ingebouwd. Het kweekstelsel bleek dus niet optimaal te zijn. Daarom werd onderzocht of het aantal cellen invloed had op de DNA-synthese. Er werden kweekjes gemaakt met verschillende aantallen thioglycollaatmakrofagen. Ze werden weer gedurende 24 uur gelabeld. In figuur 18 zijn de gemiddelden van 5 van deze experimenten weergegeven, waarbij voor ieder experiment de maximale inkorporatie op 100% is gesteld. Een maximale respons werd verkregen met $0,75 - 1 \times 10^6$ cellen per kweek. In de volgende experimenten werd daarom steeds dit aantal gebruikt. In tabel 14 zijn de resultaten weergegeven van 4 experimenten met kweken van makrofagen van op verschillende wijze voorbehandelde muizen. De resultaten zijn weergegeven als cpm ("counts per minute") per 10^5 cellen. Thioglycollaat en ook endotoxine blijken een significante verhoging van de DNA-synthese in makrofagenkweken te veroorzaken. De inkorporatie van ^3H -thymidine is na kalfsseruminjectie wel verhoogd, maar door een grote spreiding van de resultaten is dit verschil niet significant ($10\% < p < 20\%$, t-toets voor twee steekproeven).

Tabel 14 DNA-synthese door makrofagen van op verschillende manieren voorbehandelde muizen

Voorbehandeling van muizen ¹⁾	^3H -thymidine inkorporatie ²⁾	p ³⁾
Geen	2.781	—
Thioglycollaat	10.589	p < 1%
Endotoxine	6.799	p < 5%
Nuchter kalfsserum	6.333	ns

1) Thioglycollaat en kalfsserum werden intraperitoneaal toegediend, endotoxine subkutaan

2) cpm per 10^5 cellen

3) t-toets voor twee steekproeven. Het verschil tussen de effecten van thioglycollaat en endotoxine is niet significant (p > 5%)

Zoals reeds in de inleiding van dit hoofdstuk is opgemerkt, zijn er bijna geen gegevens in de literatuur over de invloed van stimulatie en aktivatie van makrofagen op de fagocytose en afbraak van virussen binnen de cel. Hirsch et al. (1970) namen waar dat in kweken van (door proteose-pepton) gestimuleerde makrofagen die met herpes simplex virus werden geïnfecteerd, minder "infective centers" ontstonden dan in kweken van normale makrofagen. Hetzelfde was het geval na infectie met Cocksackievirus. Verder nam in kweken van gestimuleerde makrofagen de titer van Cocksackievirus sneller af dan op grond van de warmte-inaktivatiecurve verwacht kon worden (Rager-Zisman en Allison, 1973). In dit experiment werd echter geen vergelijking gemaakt met normale makrofagen. Kiazimova et al. (1968) hebben de opname en afbraak van poliovirus door met zetmeel gestimuleerde muizenmakrofagen onderzocht. Slechts zeer geringe hoeveelheden infectieus virus konden - na een adsorptieperiode van één uur - intracellulair worden teruggevonden - minder dan 1 PFU per 1000 makrofagen. Kolsch (1970) gebruikte de bakteriofaag fd om de fagocytose en afbraak van virus door makrofagen te meten. Hij vermeldt in de discussie dat er voor deze proeven muizen werden gebruikt die op een leeftijd van 4 weken thymectomie hadden ondergaan.

Wij hadden verwacht een vergrote fagocytose door gestimuleerde en geaktiveerde makrofagen te zullen vinden en een verhoogde inaktivatie van het virus door geaktiveerde makrofagen. Wij vonden echter geen significante verschillen in fagocytose en intracellulaire afbraak van T7 fagen tussen kweken van normale makrofagen en van op verscheidene manieren gestimuleerde makrofagen. Het is mogelijk dat dit verband houdt met de grote variabiliteit van de experimenten. Deze moeilijkheid wordt ook vermeld bij de fagocytose-experimenten met *Staphylococcus aureus* van Whaley en Sing (1973). Een tweede mogelijkheid is dat de aktivatie van makrofagen, wat een reversibel proces schijnt te zijn, gedurende langere inkubatie in vitro weer verloren gaat.

Er bleek steeds een geringe hoeveelheid T7 bakteriofagen te worden gefagocyteerd. Ongeveer 1600 PFU per kultuur konden na 2 uur celgebonden worden aangetoond. De makrofagenkweken bevatten steeds ongeveer 100.000 makrofagen. Per 60 cellen was dus slechts 1 PFU aantoonbaar. Bij experimenten betreffende de intracellulaire "killing" van bacteriën vormde de lage fagocytose-aktiviteit in vitro ook steeds een probleem (van Furth en van Zwet, 1973). Omdat wij vooral geïnteresseerd waren in de fagocytose en inaktivatie door 3 dagen-oude kweken, was het niet mogelijk om in vivo-infectie

van de makrofagen toe te passen

Onze bevindingen betreffende de DNA-synthese van thioglycollaatmakrofagen zijn in overeenstemming met de resultaten van Keast en Birnie (1972). Ook zij vonden een significante verhoging van de DNA-synthese in deze cellen vergeleken met die in normale makrofagen. Zij gebruikten ook 3 dagen-oude kweken. Over de remming van de ^3H thymidine inkorporatie in kweken met grote aantallen makrofagen wordt door deze auteurs niets vermeld. In tegenstelling tot van Furth et al. (1973) vonden wij wel een meetbare DNA-synthese in kweken van normale makrofagen en ook na injectie van de muizen met kalfsserum. Het effect van kalfsserum was echter niet significant. Endotoxine gaf wel een significante verhoging van de thymidine-inkorporatie. Dit komt overeen met de bevindingen van Nelson (1972) die een verhoogd aantal mitosen waarnam in peritoneale makrofagen van met endotoxine behandelde muizen en met de bevindingen van Kelly en Dobson (1971). De laatstgenoemde auteurs vonden dat endotoxine bij ratten mitose van makrofagen in de lever en de milt veroorzaakt. Na lokale bestraling van deze organen trad er geen mitose op, maar wel aktivering. Mitose blijkt dus niet noodzakelijk samen te gaan met aktivering van makrofagen door endotoxine.

Een verklaring voor de hoge virusproduktie in thioglycollaatmakrofagen hebben wij met behulp van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten niet gevonden. De proeven betreffende fagocytose en inaktivatie van virus lieten geen significante verschillen zien. De verhoogde virusproduktie kan dan ook niet worden toegeschreven aan een snellere fagocytose die mogelijk gepaard zou gaan met een vertraagde afbraak van viruspartikels. De experimenten over de DNA-synthese geven meer aanwijzingen. Door thioglycollaat wordt de inkorporatie van ^3H -thymidine significant verhoogd (t-toets, $p < 1\%$). Hoewel de inkorporatie ook door endotoxine wordt verhoogd ($p < 5\%$) en het verschil tussen endotoxine- en thioglycollaatstimulatie niet significant is, nemen wij toch aan dat de verhoging van de DNA-synthese door thioglycollaat van belang is voor de produktie van de beide geteste DNA virussen.

Men kan zich afvragen of er misschien nog andere fysiologische veranderingen - dan de versterkte fagocyttaire en mikrobicide eigenschappen en het veranderde nukleïnezuurmetabolisme - in gestimuleerde of geaktiveerde makrofagen ontstaan die mogelijk de verhoogde virusproduktie in thioglycollaatmakrofagen zouden kunnen verklaren. Unkeless et al. (1974) en Gordon et al. (1974) wijzen op de produktie en het vrijkomen van fibrinolytische enzymen uit makrofagen. Thioglycollaat gaf een sterke verhoging van de fibrinolytische

aktiviteit Endotoxine, minerale olie, BCG en foetaal kalfsserum gaven een zwakke verhoging, die echter vergroot kon worden door de makrofagen bovendien nog latexpartikels te laten fagocyteren. De auteurs veronderstellen dat de inductie van de fibrinolytische activiteit afhankelijk is van persistentie van het gefagocyteerde materiaal, waarbij thioglycollaat op zich al voldoende voor makrofagen onverteerbare bestanddelen bevat.

Verder heeft men waargenomen dat er na aktivatie van makrofagen veranderingen in de celmembranen optreden (Hammond en Dvorak, 1972). Het bleek dat in de celmembranen van door endotoxine geactiveerde makrofagen in versterkte mate glucosamine werd geïncorporeerd. Dit werd aangetoond door gebruik te maken van radio-actief gelabeld glucosamine. Ook door andere onderzoekers (Wilton et al, 1975) is deze methode met succes toegepast om de aktivatie van makrofagen kwantitatief te bepalen.

Tenslotte willen we nog een andere eigenschap van makrofagen noemen die na aktivatie ontstaat, namelijk de cytotoxische activiteit als ze in contact komen met tumorcellen. Hibbs (1974) heeft dit in vitro aangetoond met makrofagen van muizen die met BCG waren ingespoten. Door thioglycollaat, pepton of minerale olie gestimuleerde makrofagen hadden volgens deze auteur geen cytocide eigenschappen, ook niet na een groeiperiode in serumrijk medium. Normale makrofagen waren in het geheel niet cytotoxisch. Daartegenover staan de resultaten van Keller en Jones (1971) en Keller (1973). Zij vonden dat door pepton gestimuleerde makrofagen van ratten wel cytotoxisch waren voor tumorcellen. Alleen al door het langere tijd kweken van normale peritoneale makrofagen onder gewone cultuurkondities werden de cellen geactiveerd en vertoonden ze cytotoxische activiteit. Waardoor het verschil in resultaten tussen de proeven van Hibbs en die van Keller veroorzaakt wordt, is niet duidelijk.

Het lijkt niet waarschijnlijk dat er een samenhang bestaat tussen de fibrinolytische of aspecifiek cytotoxische activiteit van makrofagen en hun gevoeligheid voor infectie met virussen. Het is echter wel denkbaar dat veranderingen in de celmembraan die na aktivatie ontstaan, van betekenis zouden kunnen zijn. De verhoogde gevoeligheid voor virussen zou tot stand kunnen komen door versterkte virusadsorptie aan de veranderde celmembraan. Wij hebben slechts een enkel experiment uitgevoerd om de adsorptie van muizenadenovirus aan gestimuleerde en normale makrofagen te meten. De adsorptie bleek in beide gevallen zeer gering te zijn. Daarom hebben we geen nader onderzoek hiernaar gedaan.

In hoofdstuk 1 wordt een kort overzicht gegeven van de literatuur betreffende het mononukleaire fagocyten systeem en zijn rol bij infectieziekten. Er wordt speciaal aandacht besteed aan de rol van de makrofaag bij de humorale en cellulaire immuniteit. Er wordt op gewezen dat er vooral na infecties met intracellulair groeiende mikro-organismen makrofagen met verhoogde mikrobicide capaciteit worden aangetroffen. Deze cellen worden geactiveerde makrofagen genoemd. De belangrijkste eigenschappen worden besproken, evenals de manier waarop de aktivatie tot stand komt.

Bij virusinfecties zijn de makrofagen een van de eerste celtypen die met het binnendringende virus in kontakt komen. Dit komt doordat makrofagen overal verspreid in het lichaam voorkomen en de voornaamste lichaamsvloeistoffen en weefselholtes bewaken. Makrofagen vormen een barrière ter bescherming van de voor virussen zeer gevoelige organen, zoals lever en hersenen, tegen viruspartikels die in het bloed terechtkomen. De meeste virussen worden door makrofagen opgenomen en vernietigd. Virussen die in staat zijn om te ontkomen aan de vernietiging door makrofagen en zich zelfs binnen deze cellen kunnen vermenigvuldigen, zijn meestal zeer virulent.

Muizenadenovirus (stam FL) werd in 1960 in de Verenigde Staten geïsoleerd. Het is een persisterend virus, het kan nog twee jaar na de infectie uit urine van muizen worden gekweekt. Andere adenovirussen veroorzaken ook persisterende infecties. Bij proefdieren is aangetoond dat persisterend adenovirus uit kweken van hun makrofagen kan worden geïsoleerd.

Het doel van ons onderzoek was meer inzicht te verkrijgen in de rol van makrofagen bij de pathogenese en persistentie van virussen. Wij gebruikten als model-systeem muizenadenovirus (stam FL) en zijn natuurlijke gastheer.

In hoofdstuk 2 worden proeven beschreven om de door ons gebruikt muizenadenovirusstam te zuiveren van kontaminerende virussen. Met dit oogmerk hebben wij het virus drie maal in terminale verdunningen gepasseerd. De passages werden uitgevoerd in de continue cellijn L929 die van de muis afkomstig is. Uit elektronenmikroskopisch onderzoek bleek dat het op

deze wijze gezuiverde virus de typische adenovirus-morfologie bezat.

Vervolgens worden proeven beschreven om een gevoelige en reproduceerbare titratiemethode voor muizenadenovirus te ontwikkelen. De immunofluorescerende cel-telling werd aangepast voor de titratie van adenovirus in L929-cellen. Deze methode werd vergeleken met de eindpunttitratie in buizen. Daar de immunofluorescentietitratie minder gevoelig bleek te zijn, hebben we verschillende proefomstandigheden opnieuw onderzocht. Celextracten bleken een sterk remmende invloed te hebben op de gevoeligheid van de test. Dit hing samen met de lange adsorptieperiode die noodzakelijk was. Omdat het virus in de meeste proeven niet kon worden verdund en onverdunde virus-suspensie veel celextrakt bevatte, was de enige uitweg de adsorptieperiode drastisch te verkorten. Om toch een efficiënte adsorptie te bewerkstelligen werden de cellen met virusinokulum tijdens de (kortere) adsorptieperiode bij hoge snelheid gecentrifugeerd in een ultracentrifuge. Wij hebben onderzoek gedaan naar de optimale omstandigheden voor deze titratietechniek. Verder werd de reproduceerbaarheid van de centrifugemethode bepaald evenals de lineariteit van de dosis-werkingsrelatie.

In hoofdstuk 3 worden experimenten beschreven die werden uitgevoerd om na te gaan of muizenadenovirus zich in vitro in makrofagen kan vermenigvuldigen. Makrofagen van normale en met thioglycollaat gestimuleerde muizen werden gebruikt. Op verschillende tijdstippen na virusenting werden de titers van het virus bepaald. Stimulatie door thioglycollaat werd toegepast omdat op deze wijze meer makrofagen kunnen worden verkregen als gevolg van de intraperitoneale irritatie door deze stof. Er werden opvallende verschillen in virusvermenigvuldiging gevonden tussen kweken van normale makrofagen en die van met thioglycollaat gestimuleerde muizen. De titers van adenovirus waren veel hoger in de gestimuleerde makrofagen. Om na te gaan of het effect van thioglycollaat specifiek was voor muizenadenovirus hebben we soortgelijke proeven verricht met twee andere muizevirussen, namelijk polyomavirus en muizenhepatitisvirus. Ook polyomavirus en in mindere mate muizenhepatitisvirus groeiden beter in gestimuleerde makrofagen.

Wij hebben vervolgens onderzocht of de virusproductie in makrofagen op andere wijze kan worden beïnvloed. Uit de literatuur is het bekend dat makrofagen van muizen in vivo op verschillende manieren kunnen worden geactiveerd. Enkele methoden om makrofagen te activeren werden door ons toegepast, namelijk het opwekken van een chronische *Toxoplasma* infectie, herhaalde vaccinatie met BCG en behandeling met endotoxine. Ook werden mui-

zen gestimuleerd door intraperitoneale toediening van serum van pasgeboren kalveren. Na de behandeling werden peritoneale makrofagen geoogst en werd in vitro onderzoek gedaan naar de virusproductie in deze cellen. Het bleek dat geen van de behandelingsmethoden effect had op de productie van adenovirus in makrofagen. Wij hebben verder onderzocht of de gevoeligheid van makrofagen voor adenovirus en polyomavirus veranderde tijdens akute infectie van muizen met een van deze virussen of door een persisterende infectie met adenovirus. Dit was niet het geval. Injectie van thioglycollaat bij muizen met een persisterende adenovirusinfectie veroorzaakte wel weer een versterkte virusproductie in makrofagen van deze dieren. Dus 'immune' makrofagen verschilden niet van normale makrofagen wat betreft de vermenigvuldiging van adenovirus.

In hoofdstuk 4 worden proeven beschreven om na te gaan welke eigenschappen van met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen verband zouden kunnen houden met de verhoogde virusproductie. We onderzochten op de eerste plaats het vermogen van gestimuleerde makrofagen tot fagocytose en inaktivatie van T7 bakteriofagen. Voor deze proeven werden bakteriofagen gebruikt omdat bakteriofagen goed omschreven partikels zijn die zich niet in makrofagen vermenigvuldigen en ook niet door warmte worden geïnactiveerd tijdens de experimenten. Verder kan het aantal deeltjes gemakkelijk worden bepaald door middel van een plaque test op gevoelige bacteriën. Wij zijn er niet in geslaagd om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen makrofagen van met thioglycollaat gestimuleerde muizen en makrofagen van normale of op andere wijze voorbehandelde muizen wat betreft de fagocytose en inaktivatie van bakteriofagen. Wij hebben vervolgens onderzoek gedaan naar de DNA-synthese in kweken van makrofagen. De DNA-synthese werd gemeten door de inkorporatie van ^3H -thymidine te meten. Het bleek dat deze inkorporatie in met thioglycollaat gestimuleerde makrofagen verhoogd was in vergelijking met die in normale makrofagen. Makrofagen van met endotoxine behandelde muizen toonden ook een verhoogde DNA-synthese. De DNA-synthese van thioglycollaatmakrofagen was weliswaar hoger dan die van makrofagen van met endotoxine behandelde muizen, maar het verschil was niet significant. Toch zou de DNA-synthese een belangrijke faktor kunnen zijn bij de toeneming van de virusvermenigvuldiging in makrofagen. In enkele mededelingen in de literatuur is er op gewezen dat sommige virussen beter groeien in actief delende en DNA-synthetiserende cellen dan in rustende cellen.

Ook andere eigenschappen van gestimuleerde makrofagen zouden van

belang kunnen zijn voor de virusvermenigvuldiging in deze cellen, zoals de toestand van de celmembranen. Men heeft -door bepaling van de inbouw van glucosamine- waargenomen, dat er onder invloed van stimulatie en aktivatie veranderingen in de membranen voorkomen. Het is mogelijk dat de makrofagen ten gevolge hiervan gevoeliger worden voor virusinfekties. Tot nu toe lijkt de verhoogde DNA-synthese de enige faktor die een verklaring kan vormen voor de hoge titers van sommige virussen in kweken van met thio-glycollaat gestimuleerde makrofagen.

SUMMARY

Chapter 1 reviews briefly the literature on the mononuclear phagocyte system and its role in infectious diseases. Special attention is paid to the part played by the macrophages in humoral and cell-mediated immunity. It is pointed out that macrophages with an enhanced microbicidal capacity are especially found after infections with intracellularly growing micro-organisms. These cells are called activated macrophages. Their most important characteristics are discussed as well as the mechanism of their activation.

In virus infections the macrophages are among the first cells to meet the invading virions as they are found widespread in the body and are guarding the principal body fluids and cavities. Macrophages form a barrier to protect the more sensitive organs such as the liver and the brain from virus particles in the blood stream. Most viruses are engulfed and destroyed by the macrophages. Those viruses capable of escaping the destroying mechanisms of the macrophages and even multiplying within these cells are usually very virulent.

Mouse adenovirus, strain FL, isolated in the U.S.A. in 1960, is one of the adenoviruses known to cause persistent infections. Even two years after infection it has been found in the urine of mice. In animal experiments persistent adenoviruses have been isolated from macrophage cultures.

The purpose of our investigations was to increase the knowledge of the role of the macrophages in the pathogenesis and in the persistence of virus infections. We used the mouse adenovirus strain FL and its natural host as a model in our experiments.

In chapter 2 we describe the methods used to purify our mouse adenovirus strain from contaminating viruses. To achieve this we made three terminal dilution passages of the virus in the continuous cell line L929 which is of mouse origin. Electron microscopy showed the purified virus to have the typical adenovirus morphology.

In addition, experiments are described to develop a sensitive and repro-

ducible titration method for mouse adenovirus. The immunofluorescent cell counting procedure was adapted to the titration of adenovirus in L929 cells. This method was compared with the tube dilution method for viral titrations. Because the immunofluorescence titration proved to be less sensitive we re-examined several experimental conditions. Cell extracts appeared to have a markedly inhibitory effect on the sensitivity of the test. This was associated with the long adsorption periods which were necessary. Because in most experiments the virus suspensions could not be diluted and contained much cell extract, the adsorption period had to be shortened drastically. To achieve an efficient adsorption yet, the cells and the virus inoculum were centrifuged at high speed during the adsorption period. We carried out experiments to find the optimal conditions for this titration technique. Furthermore, we determined the reproducibility of the centrifuge method and the linearity of the dose-response curve.

In chapter 3 experiments are described to determine whether mouse adenovirus can multiply in macrophages *in vitro*. Macrophages of normal and of thioglycollate stimulated mice were used. At different intervals after inoculation virus titrations were carried out. Stimulation with thioglycollate was used as in this way more macrophages can be obtained because of the intraperitoneal irritation by this compound. Marked differences were found between virus multiplication in macrophage cultures of normal and of thioglycollate stimulated mice. The titers of adenovirus were much higher in the latter. To see if the thioglycollate effect was specific for mouse adenovirus we did similar experiments with two other mouse viruses: polyomavirus and mouse hepatitis virus. Polyomavirus and to a lesser extent mouse hepatitis virus grew also better in stimulated macrophages.

In further experiments we examined if virus production in macrophages could be influenced otherwise. From the literature it is known that mouse macrophages *in vivo* can be activated in several ways. A number of methods for macrophage activation were applied, such as inducing a chronic Toxoplasma infection, vaccinating repeatedly with BCG and injecting bacterial endotoxins. Mice were also treated by administering newborn calf serum intraperitoneally. After these treatments macrophages were harvested from the peritoneal cavity and virus production in these cells was examined *in vitro*. None of the treatments appeared to have any effect on the production of adenovirus in macrophages. We examined then if the sensitivity of macrophages for adenovirus and polyomavirus changed during acute infections of

mice with one of these viruses or during a persistent adenovirus infection. No changes were found. Administration of thioglycollate to mice with persistent adenovirus infections though, caused an enhanced virus production in the macrophages of these animals. Therefore "immune" macrophages did not differ from normal ones with regard to adenovirus multiplication.

In chapter 4 we describe experiments to see which properties of thioglycollate stimulated macrophages might be associated with the enhanced virus multiplication within these cells. In the first place we investigated the capacity of stimulated macrophages to phagocytize and inactivate T7 bacteriophages. We used bacteriophages for these experiments because they are well known particles which do not multiply in macrophages nor are they thermically inactivated during the experiments. They are also easily counted in plaque tests on sensitive bacteria. With regard to their capacity to phagocytize and inactivate bacteriophages we did not find any significant differences between macrophages of thioglycollate stimulated mice and macrophages of otherwise treated or normal mice.

The next step was to examine the DNA synthesis in macrophage cultures by measuring the incorporation of tritiated thymidine. The incorporation in thioglycollate stimulated macrophages was higher than in normal macrophages. Macrophages of endotoxin treated mice also showed an increased DNA synthesis. Although thioglycollate stimulated macrophages synthesized more DNA than those of endotoxin treated mice, the difference was not significant. Nevertheless, DNA synthesis might be an important factor in increasing the multiplication of viruses in macrophages. It has been reported that some viruses multiply better in actively growing and DNA synthesizing cells than in resting ones.

Other properties of stimulated macrophages might also be of importance for the virus multiplication in these cells such as the condition of the cell membranes. It has been observed, by measuring glucosamine incorporation, that changes occur in the membranes after cell stimulation and activation. The cells might become more sensitive to virus infections as a result.

So far the increased DNA synthesis seems to be the only factor which might explain the high titers of some viruses in cultures of thioglycollate stimulated macrophages.

- Adams, M H (1959) Bacteriophages Interscience Publishers Inc New York, London
- Adolphe, M , J Fontagne, M Pelletier and J P Giroud (1975) Induction of DNA synthesis in rat macrophages in vitro by inflammatory exudate Nature (Lond) 253, 637
- Allen, E G and S Mudd (1973) Protection of mice against vaccinia virus by bacterial infection and sustained stimulation with specific bacterial antigens Infect Immun 7, 62-67
- Allison, A C (1970) On the role of macrophages in some pathological processes In Mononuclear phagocytes Ed R van Furth 422-440 Blackwell Sci Publ Oxford and Edinburgh
- Allison, A C (1974) On the role of mononuclear phagocytes in immunity against viruses Progr Med Virol 18, 15-31
- Allison, A C and L Mallucci (1965) Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures J Exp Med 121, 463-476
- Aschoff, L (1924) Das reticulo-endotheliale System Ergeb Inn Med Kinderheilkd 26, 1-118
- Avila, F R , R M Schulz and W A F Tompkins (1972) Specific macrophage immunity to vaccinia virus macrophage-virus interaction Inf Immun 6, 9-16
- Bang, F B and A Warwick (1960) Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility Proc Natl Acad Sci USA 46, 1065-1075
- Berman, L (1966) Lymphocytes and macrophages in vitro Their activities in relation to functions of small lymphocytes Lab Invest 15, 1084-1099
- Billiau, A , J J Muyembe and P de Somer (1971) Mechanism of antiviral activity in vivo of polycarboxylates which induce interferon production Nature NB (Lond) 232, 183-186

- Billiau, A., E. Schonne, L. Eykmans and P. de Somer (1970) Interferon induction and resistance to virus infection in mice infected with *Brucella abortus*. *Infect Immun* 2, 698-704
- Bishop, D. C., A. V. Pisciotto and P. Abramoff (1967) Synthesis of normal and "immunogenic RNA" in peritoneal macrophage cells. *J Immunol* 99, 751-759
- Blalock, Z. R., E. R. Rabin and J. L. Melnick (1968) Adenovirus myocarditis in mice. An electron microscopic study. *Exp Mol Pathol* 9, 84-96
- Blanden, R. V., M. J. Lefford and G. B. Mackaness (1969) The host response to Calmette-Guérin *Bacillus* infection in mice. *J Exp Med* 129, 1079-1101
- Blanden, R. V. and C. A. Mims (1973) Macrophage activation in mice infected with ectromelia or lymphocytic choriomeningitis viruses. *Aust J Exp Biol Med Sci* 51, 393-398
- Bona, C., R. Robineaux, A. Anteunis, C. Heuclin, A. Astesano (1973) Transfer of antigen from macrophages to lymphocytes. II Immunological significance of the transfer of lipopolysaccharide. *Immunology* 24, 831-840
- Budzko, D. B. and F. Kierszenbaum (1973) Endotoxin-induced protection against experimental Junín virus infection. *Arch Gesamte Virusforsch* 41, 203-210
- Burnet, F. M. (1955) Principles of animal virology 391-407. Academic Press Inc New York
- Carr, I. (1973) The macrophage. A review of ultrastructure and function. Acad Press London, New York
- Clercq, E. de and P. de Somer (1973) Protection of rabbits against local vaccinia virus infection by *Brucella abortus* and polyacrylic acid in the absence of systemic interferon production. *Infect Immun* 8, 669-673
- Coffin, D. L., A. H. Coons and V. J. Cabasso (1953) A histological study of infectious canine hepatitis by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 98, 13-20
- Crawford, L. V. (1966) A minute virus of mice. *Virology* 29, 605-612
- Crawford, L. V., E. M. Crawford and D. H. Watson (1962) The physical characteristics of polyoma virus. I Two types of particle. *Virology* 18, 170-176

- Dales, S and A F. Howatson (1961) Virus-like particles in association with L-strain cells. *Cancer Res* 21, 193-197
- Drath, D.B and M L Karnovsky (1975) Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J Exp Med* 141, 257-262
- Eustatia, J M (1971) Vermenigvuldiging van virussen in lymphocyten en macrophagen. Dissertatie Nijmegen.
- Eustatia, J M , E Maase, P van Helden and J van der Veen (1972) Viral replication in mouse macrophages. *Arch Gesamte Virusforsch* 39, 376-380.
- Faucon, N., Y Chardonnet and R Sohier (1974) Persistence of adenovirus 5 in guinea pigs. *Infect Immun* 10, 11-15.
- Fedorko, M.E and J G. Hirsch (1970) Structure of monocytes and macrophages. *Semin Hematol* 7, 109-124
- Fenner, F (1948) The pathogenesis of the acute exanthems. *Lancet* 2, 915-930
- Fishman, M (1961) Antibody formation in vitro. *J Exp Med* 114, 837-856.
- Florman, A C and J Enders (1942) The effect of homologous antiserum and complement on the multiplication of vaccinia virus in roller-tube cultures of blood mononuclear cells. *J Immunol* 43, 159-174
- Furth, R. van (1974) Classification of mononuclear phagocytes. In : *Activation of macrophages*. Eds W.H Wagner and H. Hahn 73-76. Excerpta Medica Amsterdam. American Elsevier Publ Comp Inc New York
- Furth, R. van, M.M. Diesselhoff-den Dulk and H Mattie (1973) Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med* 138, 1314-1330.
- Furth, R. van and T.L van Zwet (1973) In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In : *Handbook of experimental immunology* Ed D M. Weir 2nd ed. 36 1-36.24 Blackwell Sci Publ Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- Gadeberg, O.V., J M Rhodes and S Olesen Larsen (1975) The effect of various immunosuppressive agents on mouse peritoneal macrophages and on the in vitro phagocytosis of *Escherichia coli* O4:K3:H5 and degradation of ¹²⁵I-labelled antibody complexes by these cells. *Immunology* 28, 59-70.

- Gallily, R and H Eliahu (1974) Uptake and degradation of a polypeptide antigen by stimulated and unstimulated macrophages from responder and non-responder mice *Immunology* 26, 603-612
- Gallily, R , A Warwick and F B Bang (1964) Effect of cortisone on genetic resistance to MHV in vivo and in vitro *Proc Natl Acad Sci USA* 51, 1158-1164
- Gentry, L O and J S Remington (1971) Resistance against *Cryptococcus* conferred by intracellular bacteria and protozoa *J Infect Dis* 123, 22-31
- Gocke, D J , R Preisig, T Q Morris, D G McKay and S E Bradley (1967) Experimental viral hepatitis in the dog production of persistent disease in partially immune animals *J Clin Invest* 46, 1506-1517
- Goodman, G T and H Koprowski (1962) Study of the mechanism of innate resistance to virus infection *J Cell Comp Physiol* 59, 333-373
- Gordon, S , J Todd and Z A Cohn (1974) In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes *J Exp Med* 139 1228-1248
- Gutekunst, R R and A D Heggie (1961) Viremia and viruria in adenovirus infections Detection in patients with rubella or rubelliform illness *N Engl J Med* 264, 374 378
- Hahn, N (1966) Fluorescent cell-counting assay of yellow fever virus *J Inf Dis* 116, 33-40
- Hahn, N , J A Booth and H L Eckert (1973) Cell attachment and penetration by influenza virus *Infect Immun* 7, 341-351
- Halstead, S B , J S Chow and N J Marchete (1973) Immunological enhancement of dengue virus replication *Nature NB (Lond)* 243, 24-25
- Hammond, M E and H F Dvorak (1972) Antigen-induced stimulation of glucosamine incorporation by guinea pig peritoneal macrophages in delayed hypersensitivity *J Exp Med* 136, 1518-1532
- Hart P D Arcy (1974) Critical approach to the technique of assessment of antibacterial effects of activated mouse peritoneal macrophages In *Activation of macrophages* Eds W H Wagner and H Hahn 131-137 *Excerpta medica Amsterdam American Elsevier Publ Comp Inc New York*
- Hartley, J W and W P Rowe (1960) A new mouse virus apparently related to the adenovirus group *Virology* 11, 645-647
- Hashimoto, K , T Sugiyama and S Sasaki (1966) An adenovirus isolated from the feces of mice I Isolation and identification *Jap J Microbiol* 10, 115-125

- Heck, F C , W G Sheldon and C A Gleiser (1972) Pathogenesis of experimentally produced mouse adenovirus infection in mice. *Am J Vet Res* 33, 841-846
- Hibbs, J B (1974) Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells in vitro by activated macrophages. *J Natl Cancer Inst* 53, 1487-1492
- Hibbs, J B , L H Lambert and J S Remington (1971) Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *J Infect Dis* 124, 587-592
- Hibbs, J B , L H Lambert and J S Remington (1972) Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumour resistance. *Nature NB (Lond)* 235, 48-50
- Hirsch, M S , B Zislar and A C Allison (1970) Macrophages and age-dependent resistance to herpes simplex virus in mice. *J Immunol* 104, 1160-1165
- Holtermann O A , E Klein and G P Casale (1973) Selective cytotoxicity of peritoneal leucocytes for neoplastic cells. *Cell Immunol* 9, 339-352
- Jacoby, F and C G Lee (1969) Long-term culture of mouse peritoneal macrophages with special reference to proliferation. *J Physiol (Lond)* 203, 20P-22P
- Johnson, R T (1964) Pathogenesis of herpes virus encephalitis. II A cellular basis for the development of resistance with age. *J Exp Med* 120, 359-374
- Karnovsky, M L (1974) The biochemical basis of the functions of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. In *Progress in Immunology* II 4, 83-93. Eds L Brent and J Holborow. North Holland Publ Comp
- Keast, D and G D. Birnie (1969) An in vitro method for studying nucleic acid metabolism in murine peritoneal macrophages. *Exp Cell Res* 58, 253-260
- Keast, D and G D Birnie (1972) In vitro studies on the nucleic acid metabolism of murine peritoneal cells. *Exp Cell Res* 75, 175-184
- Keller, R (1973) Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells in vitro by nonspecifically activated macrophages. *J Exp Med* 138, 625-644.
- Keller, R and V E Jones (1971) Role of macrophages and antibody in inhibition and enhancement of tumor growth in rats. *Lancet* 2, 847-849

- Kelly, L S and E L Dobson (1971) Evidence concerning the origin of liver macrophages *Br J Exp Pathol* 52, 88-99
- Kiazimova, A A , A A Smorodintsev and G Ilyin (1968) Peculiarities of the interaction of viruses with macrophage cultures *Acta Virol* 12, 414-419
- Kindig, D A and W H Kirsten (1967) Virus-like particles in established murine cell lines electron microscopic observations *Science* 177, 1188-1191
- Kölsch, E (1970) Patterns of handling and presenting antigen by macrophages In *Mononuclear Phagocytes* Ed R van Furth 548-561 Blackwell Sci Publ Oxford and Edinburgh
- Krahenbuhl, J L and J S Remington (1974) The role of activated macrophages in specific and nonspecific cytostasis of tumor cells *J Immunol* 113, 507-515
- Kron, I , M Buchholtz, R Schulz, M Quintenz und R Wigand (1974) Laboratoriumspraxis bei Adenoviren I Qualitative und quantitative Immunofluoreszenz *Zentralbl Bakteriol (Orig)* 229 159-170.
- Langevoort, H L , Z A Cohn, J G Hirsch, J H Humphrey, W G Spector and R van Furth (1970) The nomenclature of mononuclear phagocytic cells Proposal for a new classification In *Mononuclear Phagocytes* Ed R van Furth 1-6 Blackwell Sci Publ Oxford and Edinburgh
- Levy, M H and E F Wheelock (1975) Impaired macrophage function in Friend virus leukemia restoration by statolon *J Immunol* 114, 962-965
- Lin, H and C C Stewart (1973) Colony formation by mouse peritoneal exudate cells in vitro *Nature (Lond)* 243, 176-177
- Mackaness, G B (1970a) The monocyte in cellular immunity *Semin Hematol* 7, 172-184
- Mackaness, G B (1970b) Cellular Immunity In *Mononuclear Phagocytes* Ed R van Furth 461-475 Blackwell Sci Publ Oxford and Edinburgh
- Mallucci, L (1965) Observations on the growth of mouse hepatitis virus (MHV-3) in mouse macrophages *Virology* 25, 30-37
- Mallucci, L (1966) Effect of chloroquine on lysosomes and on growth of MHV (MHV-3) *Virology* 28, 355-362
- Mallucci, L (1969) T antigen and DNA synthesis in macrophages infected with polyoma virus *Nature (Lond)* 223, 630-632

- Mallucci, L. and J. Taylor Papadimitriou (1973) Inhibition by interferon of polyoma virus-induced cell DNA synthesis in mouse peritoneal macrophages. *J Gen Virol* 21, 391-398.
- Mandel, T., P. Byrt and G. L. Ada (1969) A morphological examination of antigen reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity. *Exp Cell Res* 58, 179-182.
- Mauel, J. (1974) Cell-mediated immune mechanisms in bacterial and protozoal infections. In *Progress in Immunology II* 4, 109-116. Eds. L. Brent and J. Holborow. North Holland Publ Comp.
- Mauel, J. and V. Defendi (1971) Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J Exp Med* 134, 335-350.
- Metchnikoff, E. (1901) *L'immunité dans les maladies infectieuses*. Masson et Cie Éditeurs, Paris.
- Mims, C. A. (1964) Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bacteriol Rev* 28, 30-71.
- Missal, O., W. Vetterlein, H. Hantschel und Ch. Ludwig (1969) Isolierung von Adenovirus aus einer Mäusekolonie und dessen Charakterisierung. 1. Mitteilung. *Arch Exp Veterinaarmed* 23, 597-617.
- Muyembe, J. J., A. Billiau and P. de Somer (1972) Mechanism of resistance to virus challenge in mice infected with *Brucella abortus*. *Arch Gesamte Virusforsch* 38, 290-296.
- Nathan, C. F., H. G. Remold and J. R. David (1973) Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J Exp Med* 137, 275-290.
- Nelson, D. S. (1969) *Macrophages and immunity*. North Holland, Amsterdam.
- Nelson, D. S. (1972) Macrophages as effectors of cell-mediated immunity. In *Macrophages and cellular immunity* 45-76. Eds. A. Laskin and H. Lechevalier. London Butterworths.
- Nelson, D. S. (1973) Production by stimulated macrophages of factors depressing lymphocyte transformation. *Nature (Lond)* 246, 306-307.
- Nieuwstadt, A. P. K. M. I. van (1972) *Adenovirus infectiviteit en neutralisatie*. Dissertatie, Nijmegen.
- North, R. J. (1969) Cellular kinetics associated with the development of acquired cellular resistance. *J Exp Med* 130, 299-314.
- Numazaki, Y., S. Shigeta, T. Kumasaka, T. Miyazawa, M. Yamanaka, N. Yano, S. Takai and N. Ishida (1968) Acute hemorrhagic cystitis in children. Isolation of adenovirus type 11. *N Engl J Med* 278, 700-704.

- Old, L J , D A Clarke, E Stockert, C Porter and S W Orenski (1961) Protection against mengo virus by agents affecting the RES Fed Proc 20, 265
- Parker, J S , S S Cross, M J Collins and W P Rowe (1970) Minute virus of mice I Procedures for quantitation and detection J Natl Cancer Inst 45, 297-303
- Pearsall, N N and R S Weiser (1970) The macrophage Lea and Febiger Philadelphia
- Pereira, H G and B Kelly (1957) Latent infection of rabbits by adenovirus type 5 Nature (Lond) 180 615-616
- Petit, J C and E R Unanue (1974) Effects of bacterial products on lymphocytes and macrophages their possible role in natural resistance to Listeria infection in mice J Immunol 113, 984-992
- Pizzi, M (1950) Sampling variation of the fifty per cent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method Hum Biol 22, 151-190
- Prevost, C Le, E Levy-Leblond, J L Virelizier and J M Dupuy (1975) Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection I Role of humoral and cell-mediated immunity in resistance mechanisms J Immunol 114 221-225
- Rager-Zisman, B and A C Allison (1973) The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by Coxsackie B-3 virus J Gen Virol 19, 329-338
- Reddick, R A and S S Lefkowitz (1969) In vitro immune responses of rabbits with persistent adenovirus type 5 infection J Immunol 103, 687-694
- Reed, L J and H Muench (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints Amer J Hyg 27, 493-497
- Remington, J S and T C Merigan (1969) Resistance to virus challenge in mice infected with protozoa or bacteria Proc Soc Exp Biol Med 131, 1184-1187
- Roberts, J A (1964) Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultured macrophages from normal and ectromelia immune mice J Immunol 92, 837-842.
- Rowe, W P and J W Hartley (1962) A general review of the adenoviruses. Ann NY Acad Sci 101, 466-474

- Rowe, W P , J W Hartley, J D Estes and R J Huebner (1959) Studies of mouse polyoma virus infection I Procedures for quantitation and detection of virus J Exp Med 109, 379-391
- Ruskin, J and J S Remington (1968) Immunity and intracellular infection resistance to bacteria in mice infected with a protozoan Science 160, 72-74
- Sanford K K , W R Earle and G D Lively (1948) The growth in vitro of single isolated tissue cells J Natl Cancer Inst 9, 229-246
- Shands J W , D L Peavy, B J Gormus and J McGraw (1974) In vitro and in vivo effects of endotoxin on mouse peritoneal cells Infect Immun 9, 106-112
- Shayegani, M F S Lief and S Mudd (1974) Specific and nonspecific cell-mediated resistance to influenza virus in mice Infect Immun 9 991-998
- Sheagren, J N and H Ilahn (1974) Macrophage activation Workshop report In Progress in Immunology II 2, 330-332 Eds L Brent and J Holborow North Holland Publ Comp
- Silverstein S (1970) Macrophages and viral immunity Semin Hematol 7, 185-214
- Smith, C W and A S Goldman (1970) Interactions of lymphocytes and macrophages from human colostrum characteristics of the interacting lymphocyte J Reticuloendothel Soc 8, 91-104
- Smith, T J and R R. Wagner (1967) Rabbit macrophage interferons I Conditions for biosynthesis by virus-infected and uninfected cells J Exp Med 125, 559-577
- Soderland, S C and Y Naum (1973) Growth of pulmonary alveolar macrophages in vitro Nature (Lond) 245, 150-152
- Stewart C C , H Lin and C Adles (1975) Proliferation and colony-forming ability of peritoneal exudate cells in liquid culture J Exp Med 141, 1114-1132
- Stossel, T P (1974 a) Phagocytosis (first of three parts).New Engl J Med 290, 717-723
- Stossel, T P (1974 b) Phagocytosis (second of three parts) New Engl J Med 290, 774-780
- Stossel, T P (1974 c) Phagocytosis (third of three parts) New Engl J Med 290, 833-839
- Sugiyama, T , K Hashimoto and S Sasaki (1967) An adenovirus isolated from the feces of mice II Experimental infection Jap J Microbiol 11, 33-42

- Takeya, K , R Mori and N Imaizumi (1968) Suppressed multiplication of *Listeria monocytogenes* within macrophages derived from thymectomized mice *Nature (Lond)* 218, 1174
- Truitt, R L and I L Sheehmeister (1973) The replication of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro *Arch Gesamte Virusforsch* 42, 78-87.
- Ueda, S and T Nozima (1973) Delayed hypersensitivity in vaccinia-infected mice II Resistance of peritoneal macrophages against vaccinia infection *Acta Virol* 17, 41-49
- Unanue, E R , J C Cerottini and M Bedford (1969) Persistence of antigen on the surface of macrophages *Nature (Lond)* 222, 1193-1195
- Unkeless J C , S Gordon and E Reich (1974) Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages *J Exp Med* 139, 834-850.
- Vainio, T and J D Judah (1962) Mechanism of cellular damage by virus a study of antihistamine drugs. II Murine hepatitis virus and mouse macrophages *Exp Mol Pathol* 1, 27-36.
- Veen, J van der and M Lambriex (1973) Relationship of adenovirus to lymphocytes in naturally infected human tonsils and adenoids *Infect Immun* 7, 604-609
- Veen, J van der and A Mes (1973) Experimental infection with mouse adenovirus in adult mice *Arch Gesamte Virusforsch* 42, 235-241
- Vernon-Roberts, B (1969) Lymphocyte to macrophage transformation in the peritoneal cavity preceding the mobilisation of peritoneal macrophages to inflamed areas *Nature (Lond)* 222, 1286-1288
- Vernon-Roberts, B (1972) *The macrophage* Cambridge University Press
- Whaley, K and H Singh (1973) In vitro studies on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by peritoneal macrophages of New Zealand mice. *Immunology* 24, 25-35
- Wiener, E. and D Levanon (1968) The in vitro interaction between bacterial lipopolysaccharide and differentiating monocytes. *Lab Invest* 19, 584-590.
- Wilton, J M , D L Rosenstreich and J J Oppenheim (1975) Activation of guinea pig macrophages by bacterial lipopolysaccharide requires bone marrow-derived lymphocytes *J Immunol* 114, 388-393
- Wynne, K M , W G Spector, D A Willoughby (1975) Macrophage proliferation in vitro induced by exudates *Nature (Lond)* 253, 636-637.

Yang, C and A Nowotny (1974) Effect of endotoxin on tumor resistance in mice Infect Immun 9, 95-100

Zisman, B , M S Hirsch and A C Allison (1970) Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of herpes virus infection of young adult mice J Immunol 104, 1155-1159

De schrijver van dit proefschrift werd geboren te Uden op 22 november 1944

Van 1956 tot 1960 bezocht hij het Titus Brandsma Lyceum te Oss en vanaf 1960 het Mgr. Zwijsencollege te Veghel, waar hij in 1963 het diploma hbs B behaalde

De militaire dienstplicht werd vervuld van februari 1964 tot augustus 1965 bij de Infanterie, aanvankelijk in Maastricht, later in Oirschot.

In 1965 werd hij ingeschreven als student aan de Katholieke Universiteit te Nijmegen. Kandidaatsexamen Biologie oktober 1968. Doktoraalexamen maart 1971. Hoofdvak Zoölogie (Chemische Embryologie) bij Prof. Dr. J. M. Denucé. Bijvakken Medische Microbiologie bij Prof. Dr. J. van der Veen (op het Laboratorium voor Medische Parasitologie) en Genetica bij Prof. Dr. S. J. Geerts.

Vanaf 1971 is hij werkzaam als wetenschappelijk medewerker aan het Instituut voor Medische Microbiologie (Hoofd Prof. Dr. J. van der Veen) te Nijmegen.

STELLINGEN

I

De PHA-respons van konijneleukocyten is verlaagd na infectie of vaccinatie met rubellavirus. De opvatting van Cappel, dat deze verlaging veroorzaakt wordt door persistentie van het virus in lymfocyten, wordt door zijn experimenten niet bevestigd.

Cappel, 1975 Arch Virol 47 375

II

Het effect van de toediening van silicaatpartikels op het verloop van experimentele virusinfecties mag niet uitsluitend worden toegeschreven aan de beschadiging van makrofagen.

DuBuy, 1975 Inf Immun 11 996

III

De konklusie van Hurd en Heath, dat cyclofosfamide een beschermend effect zou hebben bij toediening van hoge concentraties virulent influenzavirus, is op zijn minst voorbarig.

Hurd and Heath, 1975 Inf Immun 11 886

IV

Voor de desensibilisatie van personen met een allergie voor bijsteken verdient het gebruik van het verdunde gif de voorkeur boven dat van een extrakt van hele bijen.

Lichtenstein, Valentine and Sobotka,
1974 N Engl J Med 290 1223

Busse, Reed, Lichtenstein and Reisman,
1975 J Am Med Ass 213 1154

V

Een zwemverbod voor water, waarin vogels werden aangetroffen die door botulisme gestorven zijn, is onnodig.

VI

Nefropathieën bij malaria kunnen in twee vormen worden onderscheiden een akute vorm die voorkomt bij ernstige *P. falciparum* parasitaemieën en die een ontstaanswijze heeft analoog aan de nefropathie bij serumziekte, en een chronische vorm die incidenteel ontstaat bij langdurige *P. malariae* infecties en waarbij auto-immune mechanismen mogelijk een rol spelen

VII

Het belang van klinisch virologisch onderzoek wordt vergroot, naarmate er meer technieken beschikbaar komen die een snelle diagnose mogelijk maken

VIII

Het is wenselijk dat in virologische publikaties het gebruikte virus-materiaal zo volledig mogelijk wordt gedefinieerd, vermelding van de passageformule is daartoe het meest geschikt

IX

De statistische verwerking van waarnemingsresultaten is helaas nog steeds voor vele medisch-biologische onderzoekers een onbekend terrein

X

Alleen kattenliefhebbers die tegelijk mensenhaters zijn, laten hun troeteldieren 's nachts hun liefde uitschreeuwen in een dichtbevolkte woonwijk

